

Aus dem Institut für Immunologie  
Direktor: Prof. Dr. Stefan Bauer  
Des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



In Zusammenarbeit mit der Universitätskinderklinik Ulm  
Direktor: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin  
Abteilung Transplantationsimmunologie  
Leitender Oberarzt: Prof. Dr. Wilhelm Friedrich



# **Depletion und Suppression humaner HLA-alloreaktiver T-Zellen durch CD95L-exprimierende Zellen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
Humanbiologie

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
Vorgelegt von

Eva-Maria Jacobsen aus Langenau  
Marburg, 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:  
15.01.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Rothmund

**Referenten:** PD Dr. Susanna Müller (Ulm); Prof. Dr. Diethard Gerns (Marburg)

**Koreferent:** Prof. Dr. Michael Lohoff

**Diese Arbeit wurde finanziert über ein 3 Jahres-Stipendium der Deutschen José-Carreras-Stiftung (DJCLS-98/Nat-2) und ein Wiedereinstiegsstipendium der Universität Ulm (ein Jahr).**

**Gewidmet meinem Mann Gereon  
und meinen Kindern Saviya, Matteo und Mareike**

**Parabase**

Freudig war, vor vielen Jahren,  
Eifrig so der Geist bestrebt,  
Zu erforschen, zu erfahren,  
Wie Natur im Schaffen lebt.  
Und es ist das ewig Eine,  
Das sich vielfach offenbart:  
Klein das Große, groß das Kleine,  
Alles nach der eignen Art;  
Immer wechselnd, fest sich haltend,  
Nah und fern und fern und nah,  
So gestaltend, umgestaltend-  
Zum Erstaunen bin ich da.

Johann Wolfgang v. Goethe

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Allogene Stammzelltransplantation .....	1
1.1.1	Gewinnung hämatopoetischer Stammzellen .....	2
1.1.2	HLA-Merkmale und deren Bedeutung für die allogene HSCT .....	3
1.1.3	Graft-versus-Host-Disease, GvHD .....	4
1.1.3.1	Akute GvHD (aGvHD).....	5
1.1.3.2	Chronische GvHD.....	6
1.1.4	Die Bedeutung von Donor T-Zellen für die allogene HSCT .....	6
1.1.5	HLA-haploidentische Stammzell-Transplantation.....	7
1.1.5.1	T-Zell Depletion für die haploidentische SCT .....	7
1.1.5.2	T-Zell Immunrekonstitution nach HLA-haploidentischer HSCT...	8
1.1.6	Donor-Lymphozyten-Infusionen (DLI) .....	8
1.1.7	Strategien zur Herstellung von nicht-alloreaktiven T-Zell-Präparaten	9
1.1.7.1	Die Suicide-Gen Strategie .....	10
1.1.7.2	Immunsuppressive/regulatorische T-Zellen .....	11
1.1.7.3	Depletion allogen-aktivierter T-Zellen .....	11
1.1.7.3.1	Photodynamische Therapie .....	11
1.1.7.3.2	Blockade von costimulatorischen Molekülen .....	12
1.1.7.3.3	Depletion alloreaktiver T-Zellen über Aktivierungsmarker	13
1.1.7.3.4	CD95/CD95L vermittelte Apoptose.....	14
1.2	Apoptose .....	15
1.2.1	Apoptoseinduktion durch CD95/CD95L.....	16
1.2.1.1	CD95 Ligand.....	18
1.2.1.2	Der Aktivierungs-induzierte Zelltot (AICD) von T-Zellen und das CD95/CD95L System .....	19
1.2.1.3	CD95L zur Inhibition alloantigen-spezifischer Immunantwort und GvHD .....	20
1.2.1.4	Antigenspezifität der CD95L vermittelten Apoptose.....	22
1.3	Regulatorische T-Zellen und GvHD .....	22
1.3.1	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> regulatorische T-Zellen (T <sub>reg</sub> ).....	23
1.3.1.1	T <sub>reg</sub> – Linienspezifikation durch den Forkhead- Transkriptionsfaktor FoxP3 .....	24
1.3.1.2	Funktionelle Eigenschaften von T <sub>reg</sub> .....	24
1.3.1.3	Antigenspezifität von T <sub>reg</sub> .....	26

Zielsetzung der Arbeit.....	27
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>29</b>
2.1 Material.....	29
2.1.1 Chemikalien .....	29
2.1.2 Materialien für die Isolierung, Kultivierung und Aufbewahrung von Zellen.....	29
2.1.3 Reagenzien für die Stimulation von T-Zellen.....	29
2.1.4 Reagenzien für die Separation von Zellen .....	30
2.1.5 Reagenzien zur Apoptosedetektion.....	30
2.1.6 Sonstige Zell-Kultur Materialien .....	30
2.1.7 Reagenzien zur Färbung, Markierung und Fixierung von Zellen .....	30
2.1.8 Antikörper .....	30
2.1.9 Zellen .....	31
2.1.9.1 Primäre Zellen .....	31
2.1.9.2 Zelllinien .....	32
2.1.10 Reagenzien und Puffer für molekularbiologische Methoden .....	33
2.1.10.1 RNA-Isolierung und RT-PCR.....	33
2.1.10.2 Klonierung und Transfektion.....	33
2.1.10.3 Oligonukleotide .....	34
2.1.10.4 Vektoren und Konstrukte .....	35
2.1.11 Geräte und sonstige Materialien .....	35
2.2 Zellbiologische Methoden .....	36
2.2.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen .....	36
2.2.2 Isolierung mononukleärer Zellen (mononuclear cells, MNC).....	37
2.2.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	37
2.2.4 Produktion von „Feeder-Zellen“ bzw. 3 <sup>rd</sup> -party Zellen .....	37
2.2.5 Kultivierung von lymphatischen Zelllinien.....	38
2.2.6 Kultivierung von Fibroblasten .....	38
2.2.7 Kultivierung und Stimulation primärer lymphatischer Zellen.....	38
2.2.7.1 Stimulation mit Phythämagglutinin (PHA) .....	39
2.2.7.2 Stimulation mit gebundenem anti-CD3 (OKT3).....	39
2.2.7.3 Stimulation mit löslichem anti-CD3 (OKT3) und anti-CD28 .....	39
2.2.7.4 Stimulation mit allogenen Zellen in der gemischten Lymphozyten-kultur (mixed lymphocyte culture, MLC) .....	40

2.2.7.5 Stimulation für die Induktion von Oberflächen-CD95L auf T-Zellen .....	40
2.2.8 Stimulation und Apoptoseinduktion mit CD95L exprimierenden C1R-A1 Zellen im simultanen Kultursystem .....	41
2.2.9 Apoptoseinduktion in allogenen aktivierten T-Zellen mit CD95L-exprimierenden Zellen (C1R/C1R-A1 oder Fibroblasten) im sequentiellen Kultursystem.....	41
2.2.10 Anreicherungsverfahren .....	42
2.2.10.1 MACS® (Magnetic absorbant cell separation).....	42
2.2.10.2 Rosettierung und Dichtegradient (Rosette-Sep™).....	43
2.2.10.3 Dichtegradient (Ficoll) zur Anreicherung lebender Zellen ....	44
2.2.11 Durchflußzytometrie .....	44
2.2.11.1 Charakterisierung von Zellen anhand ihrer Größe und Granularität .....	45
2.2.11.2 Markierung von Oberflächenantigenen .....	45
2.2.11.3 Oberflächen-Markierung mit anti-CD95L .....	45
2.2.11.4 Markierung intrazellulärer Antigene (CD95L).....	46
2.2.11.5 Apoptosedetektion mittels Annexin V-Markierung.....	47
2.2.12 Fluoreszenzmikroskopie.....	47
2.2.12.1 <i>In situ</i> Analyse CD95L transduzierter Fibroblasten.....	48
2.2.13 Nachweis von löslichem CD95L (sCD95L) mittels ELISA	48
2.2.14 Funktionelle Analysen von Zellen.....	49
2.2.14.1 Proliferationsassays.....	49
2.2.14.2 Zytotoxassays .....	50
2.2.14.3 CD95 vermittelte Apoptosesensitivität .....	51
2.2.14.4 Suppressorassays.....	51
2.2.15 Züchtung apoptoseresistenter B-Zelllinien .....	51
2.2.15.1 Magnetische Selektion und Klonierung CD95 neg. C1R-A1-Zellen .....	52
2.3 Molekularbiologische Methoden .....	53
2.3.1 Transformation kompetenter E.coli (DH5α) Bakterien.....	53
2.3.2 Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien .....	53
2.3.3 Aufbewahrung von Bakterienkulturen.....	53
2.3.4 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	53

2.3.5	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA .....	54
2.3.6	Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese .....	54
2.3.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	54
2.3.8	Aufreinigung und Präzipitation von DNA .....	54
2.3.9	Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) ...	54
2.3.10	Subklonierung von CD95L-DNA in pIRESpuro2 .....	55
2.3.11	Transfektion humaner Lymphozyten-Zelllinien .....	56
2.3.11.1	Elektroporation.....	56
2.3.11.2	Lipotransfektion .....	57
2.3.11.3	Lentivirale Transduktion von CD95L in C1R- und C1R-A1 Zellen und Fibroblasten. (T. Wenger, Ingrid Herr DKFZ Heidelberg) .....	58
2.3.12	RT-PCR zum Nachweis von mRNA .....	58
2.3.12.1	Isolation von Gesamt-RNA aus Lymphozyten .....	59
2.3.12.2	Reverse Transkription von RNA in cDNA und PCR Amplifikation .....	59
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>60</b>
3.1	Vorarbeiten .....	60
3.1.1	Sensitivität stimulierter T-Zellen gegenüber anti-CD95 induzierter Apoptose .....	60
3.1.2	Apoptoseinduktion mittels retroviral CD95L-transduzierter EBV-B Zellen.....	61
3.1.3	Generierung von apoptoseresistenten Zell-Linien für die Transfektion mit CD95L.....	62
3.1.4	Zusammenfassung Vorarbeiten .....	63
3.2	Generierung CD95L exprimierender Zellen mittels Gentransfer .....	64
3.2.1	CD95L Transfektion von C1R/C1R-A1 Zellen mittels Elektroporation und Lipofektion .....	64
3.2.2	CD95L Expression in C1R- und C1R-A1-Zellen nach lentiviraler Transduktion .....	65
3.2.2.1	Zytotoxische Aktivität von C1R-CD95L und C1R-A1-CD95L ....	67
3.2.3	Apoptoseresistenz von Fibroblasten und CD95L Expression nach lentiviraler Transfektion. ....	68
3.2.3.1	Biologische Aktivität CD95L-transduzierter Fibroblasten .....	71

3.3	Depletion alloreaktiver T-Zellen durch CD95L exprimierende Zellen.....	71
3.3.1	Funktionelle Untersuchungen von C1R-A1-CD95L Stimulatorzellen in der gemischten Lymphozytenkultur (MLC) .....	72
3.3.1.1	C1R-A1-CD95L Stimulatorzellen induzieren Apoptose in T-Zellen .....	73
3.3.1.2	CD95L exprimierende C1R-A1 Zellen reduzieren die Anzahl Aktivierungsmarker positiver T-Zellen.....	73
3.3.1.3	C1R-A1-CD95L inhibieren die Proliferation von T-Zellen in der MLC .....	74
3.3.2	Allospezifische T-Zell-Depletion nach simultaner Stimulation und Apoptoseinduktion mit CD95L exprimierenden C1R-A1 Zellen .	76
3.3.2.1	C1R-A1-CD95L inhibieren die Proliferation allospezifisch aktivierter T-Zellen .....	76
3.3.2.2	C1R-A1-CD95L reduzieren die alloreaktive Zytotoxizität von T- Zellen .....	77
3.3.2.3	Bystandereffekt durch C1R-A1-CD95L bzw. C1R-CD95L: Zytotoxizität gegen nicht aktivierte T-Zellen.....	78
3.3.3	Allodepletion durch lentiviral CD95L-transduzierte Fibroblasten nach primärer Stimulation mit EBV-B-Zellen des gleichen Spenders	80
3.3.3.1	Reduktion der allospezifischen Reaktivität durch CD95L exprimierende Fibroblasten nach Primärstimulation mit EBV-B- Zellen .....	80
3.3.4	Allodepletion im sequentiellen System mit CD95L transduzierten C1R-Zellen bzw. C1R-A1-Zellen nach Stimulation mit EBV-B-Zellen.....	83
3.3.4.1	C1R-CD95L und C1R-A1-CD95L Zellen induzieren Apoptose und reduzieren aktivierte T-Zellen	84
3.3.4.2	C1R-A1-CD95L Zellen reduzieren allospezifische Aktivität nach Primärstimulation mit EBV-B-Zellen.....	86
3.3.5	Zusammenfassung: Depletion alloreaktiver T-Zellen durch CD95L exprimierende Zellen.....	88



3.4 Untersuchung von FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen (T <sub>reg</sub> ) im Allodepletions Modell.....	90
3.4.1 Nachweis von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> und FoxP3 <sup>+</sup> Zellen nach Kultur mit C1R-A1-CD95L .....	90
3.4.2 Untersuchung von T <sub>reg</sub> nach CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Selektion .....	91
3.4.2.1 Anreicherung und Depletion von T <sub>reg</sub> .....	92
3.4.2.2 Resistenz der CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T-Zellen gegenüber CD95L vermittelter Apoptose .....	93
3.4.2.3 Dezimierung der CD25 <sup>hi</sup> Population nach C1R-A1-CD95L Exposition .....	94
3.4.2.4 Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T-Zellen nach Kultur mit CD95L exprimierenden Stimulatorzellen. ....	95
3.4.2.4.1 FoxP3 Expression in CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> bzw CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> -selektierten T-Zellen.....	96
3.4.2.4.2 Suppressorische Kapazität von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> T-Zellen .....	97
3.4.3 Erhalt regulatorischer T-Zellen im sequentiellen Kultursystem.....	99
3.4.3.1 FoxP3 Expression im sequentiellen Kultursystem .....	100
3.4.3.2 Suppressorische Kapazität von MNC im sequentiellen Kultursystem .....	100
3.4.4 Zusammenfassung: Untersuchung von FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen (T <sub>reg</sub> ) nach Kultur mit C1R-A1-CD95L .....	102
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>103</b>
4.1 Vorarbeiten zur Apoptosesensitivität von T-Zellen .....	104
4.2 Generierung CD95L exprimierender Zellen zur Stimulation und/oder Apoptoseinduktion .....	105
4.2.1 Retrovirale CD95L Transduktion von EBV-B-Zellen.....	105
4.2.2 Erzielung von Apoptoseresistenz in C1R- bzw. C1R-A1 Zellen und natürliche Apoptoseresistenz von Fibroblasten .....	106
4.2.3 Lentivirale Transduktion von B-Zell-Linien und Fibroblasten.....	107
4.2.3.1 CD95L Expression und biologische Funktionalität nach lentiviraler Transduktion.....	108

4.3 Strategien zur Depletion alloreaktiver T-Zellen mittels	
CD95L-exprimierender Zellen .....	109
4.3.1 Simultane HLA-allospezifische Stimulation und Depletion durch	
lentiviral transduzierte C1R-A1-CD95L .....	110
4.3.1.1 Unspezifische Apoptoseinduktion durch C1R-/C1R-A1-CD95L	113
4.3.2 Sequentielle HLA-allospezifische Depletion durch CD95L	
transduzierte Zellen nach allogener Stimulation.....	114
4.3.2.1 Sequentielles Depletionssystem unter Beibehaltung von HLA-	
Identität von Stimulatoren (EBV-B-Zellen) und	
Apoptoseinduktoren (CD95L transduzierte Fibroblasten) .....	115
4.3.2.2 HLA-allospezifische Depletion durch CD95L transduzierte C1R-	
A1-Zellen nach sequentieller Stimulation/Apoptoseinduktion .	115
4.4 CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> regulatorische T-Zellen in CD95L-	
Allodepletionsmodellen .....	117
4.4.1 Apoptoseresistenz von T <sub>reg</sub> im simultanen Allodepletionssystem...	118
4.4.2 Charakterisierung und Funktion von T <sub>reg</sub> im sequentiellen System	123
4.4.2.1 Fehlende Korrelation von FoxP3 Expression und Suppression	
im sequentiellen Kultursystem .....	124
4.4.2.2 Antigenspezifität von T <sub>reg</sub> im sequentiellen Kultursystem.....	125
4.5 CD95L und T <sub>reg</sub> : Zusammenspiel zweier Mechanismen	
für die hocheffiziente Reduktion von Alloreaktivität.....	128
<b>5 Zusammenfassung/ Summary .....</b>	<b>132</b>
<b>6 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>136</b>
<b>7 Literatur.....</b>	<b>138</b>
<b>8 Anhang.....</b>	<b>167</b>
8.1 CD95L Antikörpervergleich.....	167
8.1.1 Vergleich der Fluoreszenzintensität verschiedener CD95L-AK.....	167
8.1.2 Spezifität der CD95L Antikörper .....	168
8.2 Etablierung des Nachweises von Oberflächen CD95L in der	
Durchflußzytometrie.....	169
<b>9 Publikationen.....</b>	<b>172</b>
<b>10 Lebenslauf .....</b>	<b>173</b>
<b>11 Verzeichnis der akademischen Lehrer .....</b>	<b>174</b>
<b>12. Danksagung.....</b>	<b>175</b>

## 1 EINLEITUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden Methoden zur Gewinnung von T-Lymphozyten mit einem selektiv eingeschränkten Alloreaktionspotential entwickelt, die im Kontext der hämatopoetischen Stammzelltransplantation eingesetzt werden können. Als alloreaktiv (allo=fremd) bezeichnet man T-Zellen, die in der Lage sind, fremde Zellen zu erkennen und immunologische Abwehrreaktionen zu induzieren.

### 1.1 Allogene Stammzelltransplantation

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (*hematopoietic stem-cell transplantation*, HSCT) erlaubt es, das gesamte blutbildende System dauerhaft durch Zellen eines gesunden Spenders zu ersetzen. Die HSCT ist ein etabliertes und häufig das einzig verfügbare kurative Therapieverfahren zur Behandlung zahlreicher immunologischer, hämatologischer und onkologischer Erkrankungen (Kernan *et al.* 1993, Gluckman 1996, Hansen *et al.* 2001, Tabbara *et al.* 2003, Aversa *et al.* 2004).

Je nach Spender werden unterschiedliche Modalitäten unterschieden: bei der *autologen* HSCT stammen die Stammzellen vom Empfänger selbst, bei der *allogenen* HSCT werden dem Empfänger Stammzellen einer genetisch nicht identischen Person übertragen.

In den meisten Fällen müssen im Vorfeld einer HSCT hämatopoetische Zellen des Empfängers durch eine Hochdosischemo- oder kombinierte Radiochemotherapie eliminiert werden, ein Verfahren, welches als „Konditionierung“ bezeichnet wird. Durch deren myeloablativ Wirkung werden die räumlichen Voraussetzungen für die Ansiedlung (*engraftment*) des Transplantates in Nischen des Knochenmarkes geschaffen. Darüberhinaus müssen durch die Konditionierung residuale Tumor/Leukämie- bzw. nicht funktionale Zellen des hämatopoetischen System zerstört werden. Ein weiteres Ziel der Konditionierung ist die Ausschaltung der körpereigenen Immunabwehr des Empfängers, um Abstoßungsreaktionen zu verhindern. Außer der Gefahr einer Transplantatabstoßung durch T-Zellen des Empfängers besteht bei der allogenen HSCT die Möglichkeit einer in umgekehrter Richtung ablaufenden Reaktion: im Transplantat (*Graft*) enthaltene, reife T-Zellen des Spenders können gegen die fremden Zellen des Empfängers (*Host*) reagieren, man spricht von einer Graft-versus-Host (GvH)-Reaktion.

Indikationen der HSCT sind maligne Erkrankungen des blutbildenden Systems wie myeloische und lymphatische Leukämien, myelodysplastische Syndrome und maligne Lymphome. Bei den nichtmalignen Erkrankungen stehen hereditäre Defekte im Vordergrund, wie primäre Immundefekte, z.B. schwere kombinierte Immundefekte (SCID) und das Wiskott-Aldrich-Syndrom, hämatologische Erkrankungen wie z.B. Hämoglobinopathien ( $\beta$ -Thalassämia major), schwere Formen der Sichelzellanämien, Fanconi-Anämien, Osteopetrose sowie erworbene Erkrankungen wie die aplastische Anämie. (O'Reilly *et al.* 1994, Bertrand *et al.* 2002, Friedrich und Müller 2004, Lucarelli *et al.* 1997, Sevilla *et al.* 2005, Raphael 2005, Di Bartolomeo *et al.* 1992, Or *et al.* 2004, Sorell *et al.* 1981, Schulz *et al.* 2002, Storb *et al.* 1974, Jaime-Perez *et al.* 2005).

Bei malignen Erkrankungen erfolgt eine HSCT in der Regel erst bei Rezidiven oder bei hohem Rezidivrisiko und damit sehr schlechter Prognose. Dagegen ist die allogene HSCT bei vielen nicht malignen Erkrankungen die einzige kurative Therapiemöglichkeit.

### 1.1.1 Gewinnung hämatopoetischer Stammzellen

Dem Prinzip der HSCT beruht darauf, dass pluripotente Blut-Stammzellen in der Lage sind, in alle Zellen des hämatopoetischen Systems auszudifferenzieren. Die Übertragung kann daher zum Aufbau eines neuen blutbildenden Systems im Empfänger führen. Hämatopoietische Stammzellen werden klassischerweise aus Knochenmark gewonnen, dem physiologischen Ort der Hämatopoese (Lorenz *et al.* 1951, Ford *et al.* 1956, 1968, Mathe *et al.* 1967, Gatti *et al.* 1968, Thomas *et al.* 1962, Tavassoli *et al.* 1968, Thomas und Storb 1970). Das aus den Beckenkämmen der Spender aspirierte Knochenmark wird bei der Transplantation dem Empfänger peripher infundiert. Eine Alternative bietet die Gewinnung von CD34<sup>+</sup> Stammzellen aus dem peripheren Blut. Hierzu werden Stammzellen im Blut durch die Behandlung mit den Wachstumsfaktoren GM-CSF und G-CSF angereichert (Socinski *et al.* 1988, Siena *et al.* 1989, Juttner *et al.* 1990). Nach Leukapherese werden die Stammzellen mittels anti-CD34 beladener Säulen aufgereinigt. Fakultativ können sie zur weiteren Aufreinigung anschließend durch magnetische Separation hochselektiv von reifen Zellpopulationen getrennt und zur peripheren Blutstammzell-Transplantation (PBSCT) dem Empfänger infundiert

werden. Seit Mitte der 90er Jahre werden mobilisierte periphere Blut-Stammzellen (PBSC) von gesunden, adulten Spendern für allogene Transplantationen verwendet (Aversa *et al.* 1994, Lane *et al.* 1995, Körbling *et al.* 1995a/b, 2001, Harada *et al.* 1996, Wiesneth *et al.* 1998, Fliedner 1998, Müller *et al.* 1999).

Eine weitere Quelle für hämatopoetische Stammzellen stellt Nabelschnurblut dar (Gluckman *et al.* 1989, 2004, Kurtzberg *et al.* 1996, Rubinstein *et al.* 1998, Cohen und Nagler 2004). Durch die limitierte Anzahl der Nabelschnurblut-Stammzellen ist deren Anwendung vor allem in der Pädiatrie möglich, gewinnt aber auch in der Therapie adulter Patienten zunehmend an Bedeutung (Tse und Laughlin, 2005).

### 1.1.2 HLA-Merkmale und deren Bedeutung für die allogene HSCT

Die Oberflächenmerkmale von Zellen, welche die Akzeptanz bzw. die Abstoßung von Transplantaten determinieren, werden als Humane Leukozyten Antigene (HLA) bezeichnet. Sie werden durch Gene des *Major-Histocompatibility-Complex* (MHC, Haupthistokompatibilitätskomplex) kodiert. Man unterscheidet MHC Klasse I- (HLA-A,B,C) von MHC Klasse II- Antigenen (HLA DR, DP, DQ). MHC Klasse I Antigene werden auf allen Zellen, MHC Klasse II Antigene auf hämatopoetischen Zellen, wie den klassischen antigen-präsentierenden Zellen (Dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen), auf B-Zellen oder aktivierten T-Lymphozyten exprimiert. T-Zellen erkennen mithilfe ihres T-Zell-Rezeptors spezifisch Antigene, die von MHC-Molekülen präsentiert werden. Im Allgemeinen stimulieren MHC-Klasse II präsentierte Antigene CD4+ Zellen und MHC-Klasse I präsentierte Antigene CD8+-Zellen (Janeway und Travers 2005, Kuby 1994, Wahn *et al.* 2007).

Die Gene des HLA-Systems stammen jeweils zur Hälfte (Haplotyp) von Vater und Mutter, jeder Mensch besitzt damit in der Regel zwei verschiedene sogenannte Gen-Allele. Der Vererbungsmodus ist kodominant, d.h. theoretisch sind 25% der Geschwister HLA-identisch, die tatsächliche Wahrscheinlichkeit liegt jedoch durch Crossing-over der parental Chromosomen während der Meiose niedriger. Aufgrund des hohen Polymorphismus (mehr als 400 verschiedene Allele) und der Polygenie (verschiedene MHC Genregionen) der HLA-Merkmale ist die Diversität innerhalb der Bevölkerung extrem hoch. Durch die Einrichtung von Spender-Banken mit weltweit über 9 Mio. registrierten

Spendern liegt die Wahrscheinlichkeit, einen HLA-kompatiblen, nicht verwandten Spender zu finden, heute dennoch bei etwa 80%.

Spender einer allogenen HSCT sind HLA-identische Geschwister oder andere Verwandte, HLA- haploidentische Familienmitglieder oder nicht verwandte, HLA-identische Fremdspender.

Eine große Herausforderung stellt nach wie vor die HLA nicht-identische Stammzelltransplantation dar, auf die bei Fehlen eines HLA-identischen Spenders zurückgegriffen werden kann. Normalerweise wird dann ein Elternteil (oder ein anderes Familienmitglied) zur Stammzell-Spende herangezogen. Da die HLA-Konstellation zur Hälfte mit der des Kindes übereinstimmt, spricht man von haploidentischer HSCT. Die fehlende Kompatibilität erfordert eine intensive Konditionierung der Patienten und eine hochselektive Präparation der Stammzellen, um das Risiko einer GvHD so gering wie möglich zu halten (s. Abschnitt 1.1.5).

### 1.1.3 Graft-versus-Host-Disease, GvHD

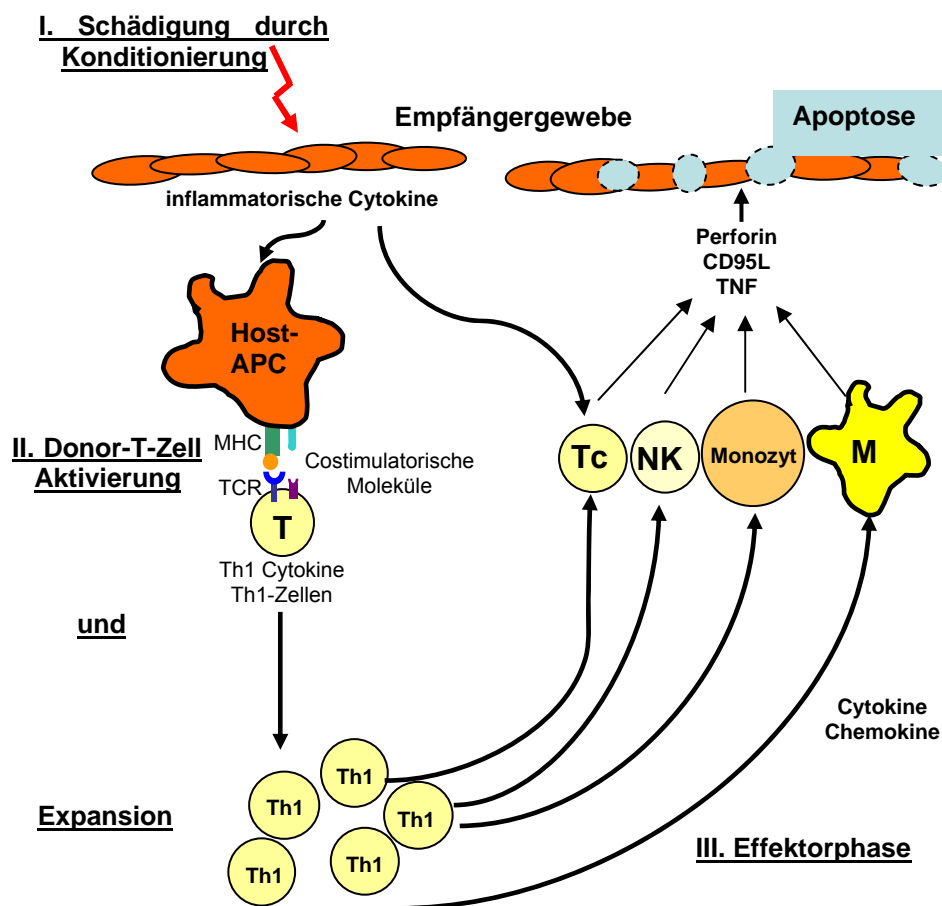
Die in Folge einer KMT auftretende Transplantat (*Graft*) – gegen (*versus*) – Empfänger (*Host*) – Erkrankung (*disease*), GvHD, wurde in den 50er und 60er Jahren im Mausmodell nach allogener KMT erstmals beschrieben (Barnes *et al.* 1956, Hildemann *et al.* 1967, van Bekkum *et al.* 1967). Für die Entstehung einer GvHD wurden 1966 von Billingham und Mitarbeitern folgende Voraussetzungen formuliert: im Transplantat müssen immunkompetente Zellen (reife T-Zellen) enthalten sein; diese Zellen müssen in der Lage sein, Zellen des Empfängers als fremd zu erkennen (sie sind „alloreaktiv“); das Immunsystem des Empfängers darf nicht in der Lage sein, eine Immunantwort gegen die transplantierten Zellen zu generieren.

Die GvHD stellt eine der Hauptkomplikationen der Stammzelltransplantation dar. Sie tritt je nach HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger in unterschiedlicher Häufigkeit und Schweregrad auf. Auch bei HLA-Identität von Spender und Empfänger kann wegen Disparität in den Minor-Histokompatibilitäts-Antigenen eine GvHD entstehen (Goulmy *et al.* 1996).

Aufgrund der Kinetik und der Pathologie werden zwei Formen unterschieden: die akute GvHD (aGvHD) und die chronische GvHD (cGvHD).

### 1.1.3.1 Akute GvHD (aGvHD)

Die aGvHD betrifft vor allem Haut, Gastrointestinaltrakt und Leber und verläuft je nach Ausprägung mit geringer Morbidität bis zu hoher Mortalität. Die Pathogenese einer akuten GvHD lässt sich in 3 Phasen einteilen, wobei die Gewebe-Toxizität der Konditionierungsmaßnahmen vor HSCT initial eine wichtige Rolle spielt: die damit verbundene Zytokinausschüttung verstärkt die Aktivierung der Spender (Donor) -T-Zellen (Abb. 1.1., Vogelsang *et al.* 2003).



**Abb. 1.1. Drei-Phasen Modell der Graft-versus-Host Disease (GvHD).** Die Gewebeschädigung durch das Konditionierungsregime verursacht die Sekretion inflammatorischer Zytokine (Phase I). Donor T-Zellen (gelb) werden durch Antigen-Unterschiede zum Empfänger (rot) aktiviert und expandieren (Phase II). Die Ausschüttung Th1-spezifischer Zytokine und damit die Expansion von Th1 Zellen führt zu einer zellvermittelten Immunreaktion, in deren Folge Effektorzellen wie cytotoxische T-Zellen (Tc), Natürliche Killerzellen (NK), Monozyten und Makrophagen (M) aktiviert werden. Die Effektorzellen verursachen durch Ausschüttung/Expressierung zytotoxischer Moleküle (z.B. Perforin, TNF, CD95L) Gewebeschäden in Haut, Leber und Darm (Phase III). Diese Schädigung produziert wiederum mehr inflammatorische Zytokine, was den Kreislauf aufrecht erhält.

### 1.1.3.2 Chronische GvHD

Die chronische GvHD ist die häufigste Spätkomplikation nach allogener Stammzelltransplantation, ungefähr 40-60% der langzeitüberlebenden adulten (Flowers et al. 2002, Vogelsang et al. 2003) und 20-35% der pädiatrischen Patienten (Zecca et al. 2002) nach einer HSCT sind betroffen. Sie wird meist im Zeitraum von 100 - 200 Tagen nach HSCT diagnostiziert (Sullivan 1991). Einer chronischen geht meist eine akute GvHD voran, selten entsteht sie auch *de novo* (Shulman et al. 1980, Vogelsang et al. 2003).

Die chronische GvHD manifestiert sich als Multiorgan-Erkrankung, bei der u.a. Haut, Gastrointestinaltrakt, Lunge, Leber, Immunsystem und hämatopoetisches System betroffen sein können, wobei der genaue Mechanismus der Organschädigung nicht genau geklärt ist. Bekannt ist, dass die inflammatorischen Infiltrate betroffener Organe im Wesentlichen aus CD8<sup>+</sup> Zellen bestehen, die durch direkten Kontakt zu den Epithelzellen Zytotoxizität ausüben (Ferrara et al. 1989). Außerdem wird im Verlauf der GvHD durch Freisetzung bestimmter Zytokine die Kollagensekretion in Fibroblasten erhöht, was zu Fibrosen führen kann (DeClerck et al. 1986, Liem et al. 1999). Chronische GvHD kann je nach Verlauf zu einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität und Herabsetzung der Lebenserwartung führen oder aber sich vollständig zurückbilden.

### 1.1.4 Die Bedeutung von Donor T-Zellen für die allogene HSCT

Im letzten Kapitel wurde die Entstehung von GvHD durch reife Donor-T-Zellen im Transplantat angesprochen. Um diese lebensbedrohliche Komplikation zu vermeiden, wurden Strategien entwickelt, Spender-T-Zellen so vollständig als möglich aus dem Transplantat zu entfernen. Dies führte zur Herabsetzung bzw. vollständigen Vermeidung des GvHD-Risikos. Hierbei zeigte sich allerdings, dass die Gefahr einer Abstoßung des Transplantates deutlich erhöht war (Martin et al. 1985). Offensichtlich ist eine geringe Donor-T-Zell Aktivität, die zu einer mild ausgeprägten GvHD führt, tatsächlich auch vorteilhaft: sie hindert noch vorhandene T-Zellen des Empfängers, gegen das Transplantat sensitiviert zu werden und verstärkt somit das Anwachsen des Transplantates („*graft-enhancing*“). Desweiteren führte die Depletion von Spender-T-Zellen aus den Transplantaten zu einer höheren Rezidivrate bei malignen Erkrankungen. Es stellte sich heraus, dass immunkompetente Donor-T-Zellen nicht nur GvHD



verursachen, sondern auch verbliebene maligne Zellen eliminieren und zu einem Graft-versus-Leukemia (GvL) bzw. Graft-versus-Tumor-Effekt führen können (Apperley *et al.* 1986, Horowitz *et al.* 1990).

Bei der T-Zell Immunrekonstitution durch Zellen des Spenders lassen sich zwei Mechanismen unterscheiden: die periphere Expansion reifer T-Zellen aus dem Transplantat und die Neubildung von T Zellen durch intrathymische Reifung von T-Vorläuferzellen. Sind reife T-Zellen im Transplantat enthalten, sind Spender T-Zellen bereits wenige Wochen nach Transplantation im peripheren Blut des Empfängers nachzuweisen (Mackall *et al.* 1997). Die Thymusreifung von Vorläuferzellen benötigt dagegen mehrere Monaten (s. Abschnitt 1.1.5).

### **1.1.5 HLA-haploidentische Stammzell-Transplantation**

Der große Vorteil einer haploidentischen HSCT ist die rasche Verfügbarkeit von Spendern (z.B. ein Elternteil). Von Nachteil sind immunologische Aspekte, die durch die HLA-Disparität verursacht werden: GvHD, Transplantatabstoßung und verzögerte oder inkomplette Immunrekonstitution.

Um das Engraftment HLA-haploidentischer Transplantate zu erleichtern, wurden zum einen eine verstärkte Immunsuppression der Empfänger eingeführt, zum anderen das Konzept der „Mega-Stammzelldosen“ entwickelt: durch die Anreicherung und Aufreinigung peripherer Stammzellen stehen wesentlich höhere Stammzellkonzentrationen als bei Knochenmarktransplantationen zur Verfügung (Bachar-Lustig *et al.* 1995, Reisner und Martelli, 2000).

#### **1.1.5.1 T-Zell Depletion für die haploidentische Stammzelltransplantation**

Essentiell für den Erfolg einer haploidentischen Transplantation ist die Vermeidung einer GvHD. Dies kann durch eine hochgradige Depletion reifer T-Zellen aus dem Transplantat erreicht werden. Methoden hierzu wurden erstmalig in den 80er Jahren entwickelt (Erythrozyten-Rosettierung und Lectin-Agglutination von T Zellen) und in den folgenden Jahren erweitert durch gegen T-Zellen gerichtete Antikörper (Reisner *et al.* 1980, 1983, Sharp *et al.* 1983, Hale *et al.* 1983, Filipovich *et al.* 1984, Blazar *et al.* 1985, Ho und Soiffer, 2001). Auch wurden immunomagnetische Methoden zur Depletion von T-Zellen und Verfahren zur Anreicherung von CD34<sup>+</sup> Stammzellen entwickelt (Knobloch *et al.* 1990, Dreger *et al.* 1994, Link *et al.* 1996, Handgretinger *et al.* 2001,

2003). Bis zu 99,9% aller T-Zellen können inzwischen je nach Depletionsverfahren eliminiert werden, was zu einer erheblichen Reduktion des GvHD-Risikos führt. Die Anwendung T-Zell gereinigter Transplantate führt allerdings zu einem deutlich erhöhtem Risiko einer Transplantatabstoßung (s. 1.1.4., Martin *et al.* 1985, Wiesneth *et al.* 1988).

### **1.1.5.2 T-Zell Immunrekonstitution nach HLA-haploidentischer HSCT**

Während nach HLA-identischer SCT frühzeitig eine Expansion von Spender-T-Zellen nachweisbar ist, die sich aus dem Pool transplantierte reifer T Zellen rekrutieren, ist die Situation nach haploidentischer Transplantation eine andere: hier entwickeln sich Spender T-Zellen erst nach 3-4 Monaten, da die T-Zell-Rekonstitution ausschließlich durch Reifung im Thymus stattfindet (Müller *et al.* 2000). Während dieser Zeit verfügen die Patienten über keinerlei T-Zell-Immunität und sind potentiell gefährdet durch Pilzinfektionen, virale Infektionen und EBV-induzierte lymphoproliferative Syndrome (Hale und Waldmann 1999, Haddad *et al.* 1998). Allerdings sind die neu gereiften T-Zellen voll funktionsfähig. Außerdem sind diese T-Zellen tolerant gegenüber dem differenten HLA-Haplotyp des Empfängers, so dass keine Immunsuppressiva verabreicht werden müssen.

### **1.1.6 Donor-Lymphozyten-Infusionen (DLI)**

Ursprünglich wurde die Gabe von Donor T-Zellen („Donor-Lymphozyten“) als Therapieverfahren für die Behandlung von Rezidiven bei hämato-onkologischer Erkrankungen etabliert (Kolb *et al.* 1990, Blair *et al.* 2005, Zeiser *et al.* 2004, Spitzer 2005), wobei dem Graft-versus-Leukemia (GvL) Effekt dieser Zellen eine entscheidende Rolle zukommt: reife T-Zellen des Spenders erkennen und eliminieren persistierende Tumorzellen des Empfängers (Horowitz *et al.* 1990, Sykes *et al.* 1999, O'Donnel *et al.* 2002, Michalek *et al.* 2003, Spitzer *et al.* 2003, 2005).

Die DLI kann auch nach haploidentischer HSCT einen wichtigen Ansatz darstellen, die Zeit der Immundefizienz zu verkürzen, da reife, immunkompetente T-Zellen verabreicht werden.

Da der Transfer unmanipulierter Lymphozyten bzw. T-Zellen allerdings immer mit einem hohen GvHD-Risiko einhergeht, dürfen keine GvHD-auslösenden T-Zell-Populationen im Donor-Lymphozytenpräparat enthalten sein. Eine

Möglichkeit hierfür stellt die gezielte Produktion von T-Zellen einer bestimmten Antigenspezifität dar. So wurden bisher z.B. antigenspezifische T-Zellen zur Therapie/Prophylaxe von Viruserkrankungen nach HSCT erprobt (Moss und Rickinson 2005). Epstein-Barr-Virus (EBV)-spezifische T-Zellen wurden zur Behandlung des EBV induzierten Lymphoproliferativen Syndroms eingesetzt (Heslop *et al.* 1994, Papadopoulos *et al.* 1994, Rooney *et al.* 1995). Ebenso führten Cytomegalie-Virus (CMV)-spezifische T-Zellen bei einer CMV-Infektion nach SCT zur Besserung der Symptome (Kawakami *et al.* 2005). Die Produktion antigenspezifischer T-Zellen ist jedoch sehr zeitaufwändig und der Anwendungsbereich begrenzt durch die Antigenspezifität der Donor T-Zellen. Das Ziel, breite Immunreaktivität zu erhalten und gleichzeitig das GvHD-Risiko herabzusetzen, kann durch die gezielte Eliminierung von T-Zellen, welche den Empfänger als fremd erkennen (alloreaktive T-Zellen), aus dem Donor-Lymphozyten Präparat erreicht werden.

### **1.1.7 Strategien zur Herstellung von nicht-alloreaktiven T-Zell-Präparaten**

In den letzten Jahren wurden verschiedene Strategien entwickelt, selektiv T-Zellen zu generieren, deren Potential, Zellen eines Empfängers als fremd zu erkennen, eingeschränkt ist und die sich daher zur Immuntherapie nach Transplantation anbieten. Einen Überblick über die verschiedenen Techniken gibt Tabelle 1.1.

Auf Methoden, welche für diese Arbeit relevant sind und/oder welche zur klinischen Anwendung kamen, wird im Folgenden näher eingegangen.

Prinzip	Technik	exp. Modelle
Antigen-spezifische T- Zellen	Adoptive Immuntherapie (DLI) mit leukämie- bzw. virusspezifischen T-Zellen (s. Abschnitt 1.1.6.).	murin, klinisch (HLA-ident, und haploident)
Vermittlung von GvL ohne GvHD durch T-Helferzellen und cytotoxische T-Zellen vom Typ 2 (Th2 und Tc2)	Generierung von Th2/Tc2 Zellen für die Transplantation <sup>1</sup>	murin
Alloreaktivität nur durch naïve-, nicht durch Memory-T-Zell-Population.	Verabreichung von Memory T-Zellen <sup>2</sup>	murin
Reifung (und Toleranzinduktion) von T-Vorläufer-Zellen im Thymus des Empfängers	Generierung und Verabreichung von T- Vorläuferzellen <sup>3</sup>	murin
Schnelle Vermittlung von GvL-Effekten	Suicide-Gen Insertion in T-Zellen erlaubt die Eliminierung allogener T-Zellen, sobald der gewünschte GvL-Effekt eingetreten oder GvHD auftritt.	klinisch (HLA-ident, HLA-haploident)
Suppression allogener Reaktionen durch regulatorische T-Zellen	Selektion und Transfusion regulatorischer T-Zellen.	murin
Unterscheidung von allogen-aktivierten T-Zellen von nicht aktivierten T-Zellen anhand ihres Phänotyps.	Selektive Depletion oder Anergie-Induktion alloreaktiver T-Zellen über: 1. Aktivierungsmarker: -Selektion Aktivierungsmarker-negativer T-Zellen -CD25-Immunotoxin 2. Blockade costimulatorischer Moleküle (CTLA4, CD40L) 3. Pgp-Photodynamische Therapie 4. CD95/CD95L	<i>in vitro</i> , murin, klinisch (HLA-haploident) <i>in vitro</i> , murin, klinisch (HLA-ident, haploident), murin, klinisch (HLA-haploident) <i>in vitro</i> , murin, klinisch <i>in vitro</i> , murin

**Tab. 1.1. Übersicht über nicht-pharmakologische Methoden zur Prävention einer GvHD.** Modifiziert und ergänzt nach Barret et al. 2003. <sup>1</sup> Fowler et al. 1994, 1996; <sup>2</sup>Anderson et al. 2003, Chen et al. 2004, Le et al. 2005 ; <sup>3</sup> Zakrewski et al. 2006. weitere Referenzen s. Text

### 1.1.7.1 Die Suicide-Gen Strategie

Eine Strategie zur Eliminierung alloreaktiver T-Zellen beinhaltet den Transfer sogenanter Suicide-Gene in Donor-T-Zellen. Durch die Expression des Suicide-Gens Herpes-Simplex-Virus Thymidin-Kinase (TK) beispielsweise wird das Nucleosidanalogue Gancyclovir (GCV) zu GCV-Triphosphat phosphoryliert, welches anstelle von Desoxyguanosin-Triphosphat in die DNA eingebaut wird und damit die DNA-Elongation effektiv inhibiert. Auf diese Weise wirkt GCV

toxisch für proliferierende Zellen (Bordignon *et al.* 1995). So kann theoretisch eine GvHD nach Übertragung TK-transduzierter T-Zellen durch Verabreichung von GCV kontrolliert werden. Zwei klinische Phase I-II Studien (HLA-identische Konstellation) zeigten eine Reduktion der GvHD Inzidenz (Bonini *et al.* 1997, Tiberghien *et al.* 2001). Aus einer weiteren klinische Studie, in der die Suicide-Gen-Therapie in der haploidentischen HSCT erprobt wird, sind erste Ergebnisse bekannt: hier konnte in 3 von 5 Patienten eine beschleunigte Immunrekonstitution erreicht werden, einer der 3 Patienten entwickelte allerdings eine akute GvHD Grad II (Ciceri *et al.* 2005).

Probleme dieser Strategie sind eine reduzierte EBV-Reaktivität, Veränderungen des T-Zell-Rezeptor-Repertoires, und mögliche Resistenzentwicklung gegen Gancyclovir (Garin *et al.* 2001, Robinet *et al.* 2005).

Ein weiterer Suicide-Gen Ansatz ist der Transfer von chimären Molekülen, welche die intrazelluläre Komponente des Apoptose-induzierenden CD95 (Fas, APO1)-Proteins und einen extrazellulären Rezeptor (z.B. Östrogenrezeptor) besitzen. Bei Bindung eines Liganden (z.B. Östrogen) an die extrazelluläre Komponente dieser chimären Moleküle wird die Kreuzvernetzung von CD95 und damit die Apoptosecascade induziert (s. auch Abschnitt 1.2.1, Thomis *et al.* 2001, Kametaka *et al.* 2003, Berger *et al.* 2003, 2004).

### **1.1.7.2 Immunsuppressive/regulatorische T-Zellen**

Die Übertragung immunsuppressiver/regulatorischer T-Zellen stellt einen weiteren potentiellen Ansatz zur Vermeidung einer GvHD dar. Hierauf wird im Abschnitt „Regulatorische T-Zellen“ (1.3.) näher eingegangen.

### **1.1.7.3 Depletion allogenen-aktivierter T-Zellen**

Aktivierte T-Zellen lassen sich von unstimulierten T-Zellen anhand ihres Phänotyps unterscheiden, was zu verschiedenen Ansätzen führte, gezielt T-Zellen nach alloantigenspezifischer Aktivierung zu eliminieren. Allen Methoden gemeinsam ist die vorangehende Aktivierung der (Donor)-T-Zellen in einer sogenannten gemischten Lymphozytenkultur (*mixed lymphocyte culture*, MLC) mit allogenen (Empfänger-) Stimulatorzellen.

#### **1.1.7.3.1 Depletion alloreaktiver T-Zellen über Photodynamische Therapie**

Eine Möglichkeit, alloreaktive T-Zellen zu depletieren stellt die photodynamische Therapie dar. Hierbei wird die Tatsache genutzt, dass Zellen in der Lage sind, sogenannte photosensibilisierende Substanzen, z.B. Rhodamin-

Derivate aufzunehmen. Dabei kann Rhodamin in alle Zellen eindringen und wird normalerweise durch P-Glycoprotein (Pgp) aktiv wieder aus den Zellen gepumpt. In stimulierten T-Zellen jedoch ist Pgp inaktiv (Pilarski *et al.* 1995), so dass das Rhodaminderivat in diesen Zellen angereichert wird und nach Lichtexposition durch Oxidation der Mitochondrien zu deren selektiven Eliminierung führt. Die Effektivität dieser Methode konnte sowohl *ex vivo* im murinen und humanem System als auch *in vivo* im Mausmodell gezeigt werden (Guimond *et al.* 2002, Chen *et al.* 2002, Le *et al.* 2005, Boumedine *et al.* 2005). Eine erste klinische Studie zur Verabreichung von photodynamisch aufbereiteten DLI nach haploidentischer Transplantation wird derzeit durchgeführt: Bislang wurden 8 Patienten mit eskalierenden Zell Dosen von  $1 \times 10^4$  /kg Körpergewicht bis  $3,2 \times 10^5$  /kg Körpergewicht behandelt. Vorläufige Daten zeigen, dass keiner der Patienten eine GvHD entwickelte und die Inzidenz viraler Infektionen geringer war, als in der Kontrollgruppe. Allerdings ist bisher die beobachtete Immunrekonstitution gering (Roy *et al.* 2007, Perruccio *et al.* 2008).

#### **1.1.7.3.2 Anergieinduktion in alloreaktiven T-Zellen durch die Blockade von costimulatorischen Molekülen**

T-Zellen benötigen zur primären Aktivierung außer der Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit dem MHC-Komplex der antigenpräsentierenden Zelle (APC, Signal 1) ein weiteres Signal, das durch sogenannte Costimulatoren vermittelt wird (Signal 2). Wichtige costimulatorische Signale werden durch die B7(CD80)/CD28 und CD40/CD40L Bindung vermittelt. Die Blockade des costimulatorischen Signals resultiert in der Induktion von Anergie, die T-Zellen können dann trotz optimaler Stimulation nicht aktiviert werden. Tierversuchsstudien zeigten, dass die Störung der costimulatorischen Signale eine erfolgreiche Transplantation histoinkompatibler Transplantate erlaubte (Blazar *et al.* 1997, 1999). Durch eine lösliche Form von CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte associated protein-4*, CD152), welches mit CD28 um die Bindung an B7 konkurriert, konnte *in vitro* in Transplantaten, die mit Empfängerzellen aktiviert wurden, Toleranz erzeugt werden. In einer klinischen Studie konnte die GvHD-Inzidenz nach haploidentischer Transplantation mit dieser Methode reduziert werden. Von 12 Patienten entwickelten dennoch 3 eine akute GvHD (Guinan *et al.* 1999). Ein großes Problem dieser Methode stellt die Reduktion

der Immunantwort gegen Pathogene dar (Williams *et al.* 2002), was durch die Tatsache bestätigt wird, dass vier der 12 Patienten in der Studie von Guinan und Mitarbeitern an Infektionen starben. Umgekehrt stellte sich im Tiermodell heraus, dass persistierende Infektionen des Empfängers die Toleranzinduktion mittels CTLA-4-Ig bzw. anti-CD40-Ligand verhinderte (Williams *et al.* 2002).

#### **1.1.7.3 Depletion alloreaktiver T-Zellen über Aktivierungsmarker**

Die Expression sogenannter Aktivierungsmarker, Moleküle, welche auf T-Zellen erst nach Aktivierung bzw. dann verstärkt exprimiert werden, boten ein attraktives Ziel für die selektive Depletion alloreaktiver Zellen.

Eine Möglichkeit ist die magnetische Depletion stimulierter Zellen nach Bindung von beads-gekoppelten Antikörpern an Aktivierungsmarker. Im Mausmodell resultierte die Anwendung CD69-depletierter Zellen in einer reduzierten GvHD-Inzidenz (Koh *et al.* 1999, 2002). *In vitro* Studien mit humanen Zellen wurden unter Anwendung von Antikörpern gegen CD25 (Garderet *et al.* 1999), CD69 (Davies *et al.* 2004, Hartwig *et al.* 2006), und einer Kombination von anti-CD69 und anti-CD25 (Fehse *et al.* 2000) durchgeführt. Weiter wurde eine durchflußzytometrische Selektion mittels Zellsorter nach Markierung von CD25, CD69 und HLA-DR getestet (Rencher *et al.* 1996). CD25 wurde auch in Kombination mit Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFSE), einem Farbstoff, dessen Intensität in nicht proliferierenden Zellen erhalten bleibt und in proliferierenden Zellen schwächer wird, eingesetzt: mittels Zellsorter wurden CD25<sup>-</sup> CFSE<sup>++</sup> Zellen als nicht aktivierte, nicht proliferierende Population nach allogener Stimulation selektioniert (Godfrey *et al.* 2004-1). Ebenfalls führte die Depletion CD38 positiver und CD4 hoch-exprimierender Zellen durch fluoreszenzaktiviertes Zellsorting zu einer Reduktion der Alloreaktivität (Martins *et al.* 2004).

In unserer eigenen Gruppe wurde für eine klinischen Pilotstudie eine Kombination aus PE-markierten Antikörpern gegen CD25, CD69, CD71 und HLA-DR eingesetzt und nachfolgend mit magnetischen anti-PE-Beads depletiert. Dieser Prozedur ging eine Behandlung mit L-Leucyl-L-Leucin-Methyl-Ester (LLME) voran, um cytotoxische T-Zellen zu eliminieren (Thiele *et al.* 1990, Brown *et al.* 1993, Rosenfeld *et al.* 1995). Die Effektivität der Allodepletion wurde durch Restimulationsassays und in einem Skin-Explant Modell, untersucht, bei dem residuale Alloreaktivität im Hautbiopsat getestet wurde.

Trotz effektiver Reduktion alloreaktiver T-Zellen um 1,5-3 log trat in der klinischen Studie eine akute GvHD Grad I in 2 von 3 Patienten auf (Ege *et al.*, Manuskript in Vorbereitung).

Eine andere Strategie entwickelten Cavazzana-Calvo und Mitarbeiter (1990): mittels Immunotoxinen gegen die  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) wurden in einer gemischten Lymphozyten Kultur (mixed lymphocyte culture, MLC) *in vitro* allogen aktivierte T-Zellen eliminiert. Eine erhebliche Reduktion der Alloreaktivität, eine deutlich geringere GvHD-Inzidenz im Mausmodell (Cavazzana-Calvo *et al.* 1994) und der Erhalt antileukämischer und antiviraler Aktivität der Immunotoxin-behandelten T-Zellen (Montagna *et al.* 1999) konnte gezeigt werden. Die erste klinische Studie zur schnelleren Immunrekonstitution nach haploidentischer HSCT mittels anti-CD25-Immunotoxin behandelten T-Zellen wurde bei pädiatrischen Patienten 2002 von André-Schmutz und Mitarbeitern veröffentlicht. Aus einem ähnlichen Ansatz, in dem zur *in vitro* Stimulation statt allogener MNC (Mononukleäre Zellen) EBV-transformierte B-Zell-Linien (EBV-B-Zellen) verwendet wurden, sind ebenfalls erste klinische Ergebnisse bekannt (Amrolia *et al.* 2003, 2005, 2006). In beiden klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass das GvHD-Risiko herabgesetzt, aber nicht ausgeschaltet werden konnte.

### **1.1.7.3.4 Depletion alloreaktiver T-Zellen durch CD95/CD95L vermittelte Apoptose**

Ein vielversprechender Ansatz zur Depletion alloreaktiver T-Zellen besteht in der Induktion des Aktivierungs-induzierten Zelltodes (AICD) über den CD95/CD95L Mechanismus. Hierauf wird im Kapitel Apoptose (1.2.) näher eingegangen.



## 1.2 Apoptose

Der Begriff Apoptose (griechisch: „Herabfallen von Blättern von den Bäumen“) als Bezeichnung für den programmierten Zelltod wurde 1972 erstmals von Kerr und Mitarbeitern geprägt. Die Apoptose ist ein zentraler zellulärer Mechanismus, der als Gegenspieler der Zellproliferation für die Erhaltung der Gewebekomöostase sorgt. Sie spielt eine entscheidende Rolle während der Embryonalentwicklung, der Umbildung von Knorpel und Knochen, der Entwicklung und Funktion des Immunsystems, der Kontrolle von Tumoren, der Beseitigung alter, verletzter, mutierter oder „gefährlicher“ Zellen (Krammer, 2000). Damit ist diese Form des Zelltodes ein wichtiger physiologischer Vorgang, ohne den höhere Lebensformen nicht existieren könnten.

Ein wesentliches Kriterium der Apoptose ist die Tatsache, dass dieser Vorgang ein vom Organismus selbst ausgelöster, durch vielfältige Signale regulierter Prozess ist. Zellen, die den programmierten Zelltod durchlaufen, zeigen charakteristische morphologische und biochemische Besonderheiten. Zu nennen sind hier das Schrumpfen der Zellen, Chromatin-Aggregation, Ausstülpungen der Zellmembran (Zeiose), Translokation von Phosphatidylserin zur Außenseite der Zellmembran und Fragmentierung des Zellkerns und der DNA. Zuletzt werden membrangebundene Vesikel abgeschnürt, die als apoptotische Körperchen (*apoptotic bodies*) bezeichnet werden. Sie enthalten Fragmente von Zellkern, Zytoplasma und intakte Mitochondrien und werden von Phagozyten oder benachbarten Zellen schnell phagozytiert. Dadurch werden im Rahmen der Apoptose im Gegensatz zur Nekrose, einer anderen Form des Zelltodes, nie Entzündungsreaktionen beobachtet. (Steller 1995, Thompson 1995, Golstein 1997, Nagata 1997, Evan und Littlewood 1998, Krammer 2000). Apoptose kann in der Regel über zwei Signalwege induziert werden: durch mitochondrienabhängige Molekülinteraktionen (intrinsische Apoptoseinduktion) oder durch Aktivierung von Todesrezeptoren über die Bindung der korrespondierenden Liganden (extrinsische Apoptoseinduktion) (Nagata 1997, Green und Reed 1998, Green 1998). Nachfolgend kommt es zur kaskadenförmigen Aktivierung proteolytischer Enzyme, den sogenannten Caspasen, welche zelluläre Substrate am carboxyterminalen Ende von Asparaginsäureresten spalten und die apoptotische Morphologie und DNA-

Fragmentierung einleiten (Cohen 1997, Villa *et al.* 1997, Raff 1998, Hengartner 2000).

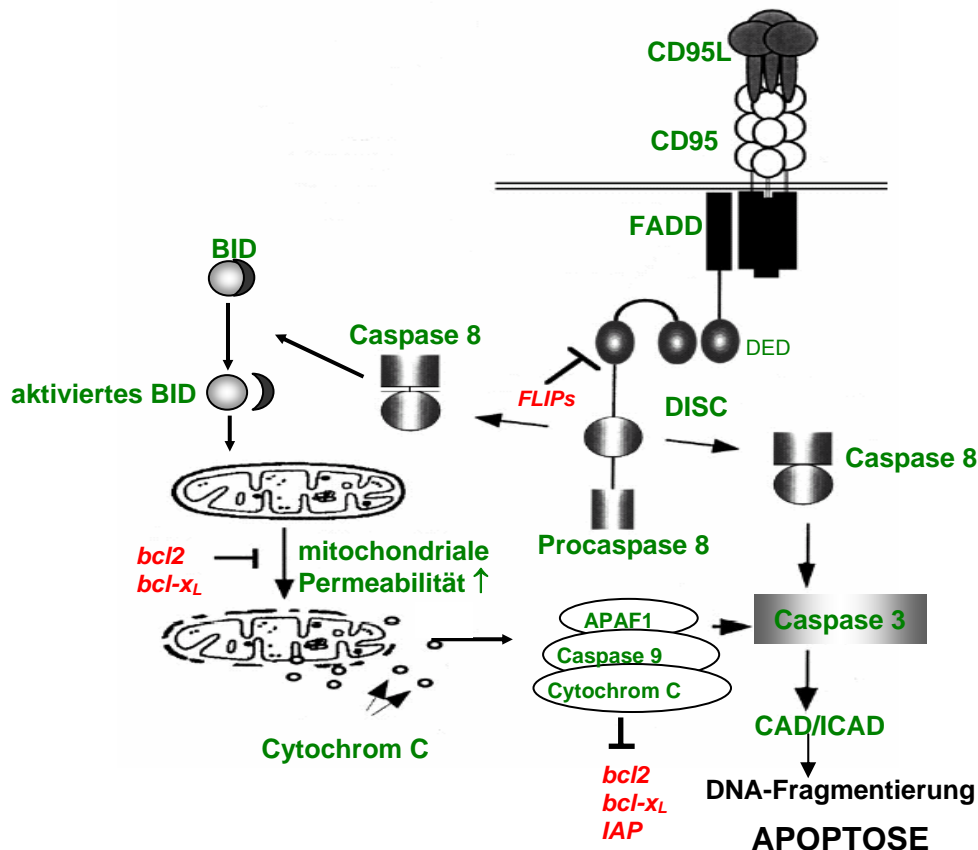
Insbesondere unter Mitgliedern der TNF (Tumornekrosefaktor) -Superfamilie sind apoptoseinduzierende Liganden der Todesrezeptoren zu finden. Hierzu gehören TNF, CD95 Ligand (CD95L, APO-1 Ligand) TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand* = APO-2L) und Apo-3-Ligand (*Death-Receptor* (DR)-3 Ligand) (Krammer 1999, Nagata 1997, Nagata und Golstein, 1995, Roy, 2000, Cleveland und Ihle, 1995, Fraser und Evan, 1996, Ashkenazi und Dixit 1998). Das für diese Arbeit relevante CD95/CD95L System ist am besten untersucht und wird in den folgenden Abschnitten näher beschrieben.

### 1.2.1 Apoptoseinduktion durch CD95/CD95L

Mit CD95 (APO-1, Fas) wurde erstmals ein Zelloberflächenrezeptor beschrieben, der in der Lage ist, Apoptose zu induzieren (Trauth *et al.* 1989, Yonehara *et al.* 1989, Itoh *et al.* 1991).

CD95 wird in vielen Geweben konstitutiv und in lymphohämatopoetischen Zellen nach Stimulation verstärkt exprimiert. Es gehört zur TNF-Rezeptorfamilie und ist ein Transmembranprotein mit einem durch differentielle Glykosylierung variablen Molekulargewicht von 42-52 kDa. CD95 ist charakterisiert durch 3 extrazelluläre, zysteinreiche Domänen, einer Transmembranregion und intrazellulären „Todesdomänen“ (*Death domain*, DD). Das Signal zur Apoptoseinduktion kommt durch die Trimerisierung oder Multimerisierung des Rezeptors zustande und kann entweder durch Bindung von CD95-Ligand oder experimentell von agonistischen, stimulierenden Antikörpern ausgelöst werden. Auf die Rezeptorvernetzung folgt die Aggregation der „Todesdomänen“ und durch Interaktion mit FADD (*Fas-associated death domain*)/MORT1 und Procaspase 8 die Bildung des sogenannten *Death Inducing Signalling Complex* (DISC). Durch diese Prozesse wird in den meisten Zellen (Typ I) die sogenannte Caspase-Kaskade in Gang gesetzt, wobei Procaspase 8 gespalten wird und die aktive Form der Caspase-8 (FLICE) resultiert, die wiederum Effektorcaspasen wie die Caspase 3 aktiviert (Chinnaiyan *et al.* 1995, Boldin *et al.* 1996, Muzio *et al.* 1996, 1998, Medema *et al.* 1997, Zhang *et al.* 1998-a, Yeh *et al.* 1998) (Abb. 1.2.). In manchen Zellen (Typ II) werden Mitochondrien als Verstärker des Signalweges genutzt. Hier reicht eine geringe Aktivität von Caspase-8 aus, um das Molekül BID zu spalten, das zur Freisetzung von

Cytochrom C (Cyt C) aus den Mitochondrien führt. Mit Apaf-1 bildet Cyt C das Apoptosom, welches Caspase-9 aktiviert, wodurch wiederum Effektorcaspasen wie Caspase-3 aktiviert werden (Scaffidi *et al.* 1998). Durch aktive Caspase 3 schließlich wird in beiden Signalwegen die Caspase-aktivierte DNase (CAD) durch Abspaltung des inhibitorischen Moleküles ICAD (*inhibitor of CAD*) aktiviert. CAD spaltet die internukleäre DNA in Fragmente von ca. 180 Basenpaaren, welche charakteristisch für die Apoptose sind (Abb. 1.2.).



**Abb. 1.2. CD95/CD95L Signalweg.** Nach Bindung von CD95L an CD95 binden Adapterproteine (z.B. FADD) an die Todesdomänen des CD95-Trimeres. FADD interagiert durch sogenannte Todeseffektordomänen (DED) mit Procaspase 8. Der Komplex aus CD95, FADD und Procaspase 8 wird als Todes-induzierender-Signalkomplex (*Death-inducing-signalling-complex*, DISC) bezeichnet. Procaspase 8 wird am DISC autokatalytisch gespalten, so dass das aktive Enzym Caspase 8 entsteht. Diese wiederum aktiviert weitere Caspasen, die Effektorcaspasen, z.B. Caspase 3. Alternativ aktiviert Caspase 8 das Molekül BID, das in die mitochondriale Membran inseriert und den mitochondrialen Apoptoseweg initiiert. Ein Signalcomplex aus APAF-1 (*Apoptosis activating factor-1*), Caspase 9 und Cytochrom C setzt aktive Caspase 9 frei, welche wiederum die Effektorcaspase 3 aktivieren kann. Die Effektorcaspasen spalten sogenannte Todessubstrate und führen so zum morphologischen und biochemischen Bild der Apoptose. Zum Beispiel aktiviert Caspase 3 die Caspase-spezifische DNase (CAD), indem das inhibitorische Element I-CAD gespalten wird. Aktive CAD kann in den Zellkern passieren und dort die DNA in die für Apoptose charakteristische 180bp Fragmente schneiden. Eine Inhibition der Apoptose ist auf unterschiedlichen Ebenen durch Moleküle der Bcl-Familie, FLIPs (*Fllice [=Caspase 8] inhibitory proteins*), Caspaseninhibitoren der IAP (*Inhibitors of Apoptosis Proteins*)-Familie möglich. (Modifiziert und ergänzt nach Lenardo *et al.* 1999)

Hinweise auf die bedeutenden biologischen Funktionen dieses Moleküls und dessen Liganden CD95L geben die Mausstämme *lpr* und *gld*, bei denen das CD95-Gen (*lpr*) bzw. das CD95 Ligand-Gen (*gld*) mutiert ist. Symptome beider Mutationen sind ein lymphoproliferatives Syndrom, Splenomegalie, Nephritis, Arthritis und weitere Anzeichen einer Autoimmunerkrankung. In beiden Mutationen findet sich eine erhöhte T-Zell-Zahl (Nagata und Suda, 1995). Das CD95 System ist entscheidend an der Beendigung von Immunantworten beteiligt, indem nicht mehr benötigte T-Zellen eliminiert werden (Lynch *et al.* 1995). Eine Störung des Systems wie bei *gld* und *lpr* geht somit mit einer erhöhten Immunaktivität einher. 1995 wurde erstmals beim Menschen die Mutation des CD95 Genes mit dem sogenannten Autoimmunen Lymphoproliferativen Syndrom (ALPS) in Zusammenhang gebracht (Fisher *et al.* 1995, Rieux-Laucat *et al.* 1995). Mittlerweile sind sowohl homozygote als auch heterozygote Mutationen von CD95 und CD95L, die zu ALPS führen, beschrieben (Wu *et al.* 1996, Cheng *et al.* 1994, Jackson *et al.* 1999, Lenardo *et al.* 1999, Straus *et al.* 2001, Del-Rey *et al.* 2006).

### 1.2.1.1 CD95 Ligand

CD95L, ein Typ-II Transmembranprotein von etwa 40 kDa, gehört zur TNF-Liganden Superfamilie (Suda *et al.* 1993, Takahashi *et al.* 1994). CD95L wird im Gegensatz zu CD95 nur in wenigen Geweben konstitutiv exprimiert, kann aber z.B. durch Stimulierung von Lymphozyten induziert werden (Suda *et al.* 1993). Gewebe, in denen das Molekül konstitutiv exprimiert wird, werden als immunprivilegierte Organe bezeichnet, da CD95L hier vor der Attacke durch aktivierte T-Zellen schützt. Zu ihnen gehören Hoden und Eierstöcke, das Gehirn und die vordere Augenkammer (Kabelitz *et al.* 1993, Suda *et al.* 1995, Griffith und Ferguson 1997, Newell und Desbarats, 1999). Während der Schwangerschaft sorgt die CD95L Expression in Trophoblastenzellen dafür, dass mütterliche T-Zellen, die durch die fötalen Zellen aktiviert werden, eliminiert werden (Hunt *et al.* 1997, Uckan *et al.* 1997).

Ebenso konnte in einem anderen Kontext Immunprivilegierung gefunden werden: auf einer Anzahl verschiedener, auch nicht lymphatischer Tumoren wurde eine CD95L Expression nachgewiesen. Fatalerweise wird auf diese Weise die anti-tumorale Immunabwehr durch T-Zellen umgangen (Green und Ware, 1997).

CD95L wird auf 3 verschiedene Arten exprimiert: (1) membrangebunden auf der Zelloberfläche (mCD95L), (2) membrangebunden gespeichert in intrazellulären Mikrovesikeln, die nach verschiedenen physiologischen Stimuli in den Interzellularraum freigesetzt werden (Albanese *et al.* 1998, Bossi und Griffiths 1999, Martinez-Lorenzo *et al.* 1999) und (3) in löslicher Form (sCD95L), durch das Abspalten des membrangebundenen Proteins mittels Matrix-Metalloproteinasen, ein Prozess, der innerhalb weniger Minuten nach Oberflächenexpression stattfindet (Kayagaki *et al.* 1995, Tanaka *et al.* 1995, 1998). Während für den membrangebundenen Liganden eine hohe Effizienz der Apoptoseinduktion beschrieben ist, kann sCD95L unter bestimmten Bedingungen sowohl anti-apoptotische als auch pro-apoptotische Funktionen haben. sCD95L konkurriert mit mCD95L um die Bindung an den CD95-Rezeptor. Da sCD95L als Homotrimer ineffektiv in der Aggregation des CD95-Rezeptors ist, resultiert eine anti-apoptotische Wirkung (Suda *et al.* 1997, Chen *et al.* 1998, Schneider *et al.* 1998). Eine pro-apoptotische Wirkung von sCD95L ist nach dessen spontaner Aggregation (Tanaka *et al.* 1995, 1996, Suda *et al.* 1997, Hohlbaum *et al.* 2000) oder nach Assoziation mit extrazellulären Matrix-Proteinen (Aoki *et al.* 2001, Chen *et al.* 1998) beschrieben. Auch chemotaktische Funktionen von sCD95L konnten nachgewiesen werden (Seino *et al.* 1998, Ottonello *et al.* 1999).

### **1.2.1.2 Der Aktivierungs-induzierte Zelltod (AICD) von T-Zellen und das CD95/CD95L System**

Die komplexe Funktion des Immunsystems ist abhängig von fein abgestimmten Vorgängen, die das Überleben und/oder die physiologische Eliminierung antigen-spezifischer T-Zell Klone regulieren. „Der Aktivierungs-induzierte Zelltod (*activation-induced cell death*, AICD) ist der wichtigste homöostatische Mechanismus des Immunsystems, T-Zell Immunantworten zu kontrollieren, Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen zu vermitteln und Autoimmunität vorzubeugen“ (Askenasy *et al.* 2005). Der Begriff AICD wurde erstmals 1989 in Zusammenhang mit dem Sterben von T-Zell-Klonen nach wiederholter CD3-Stimulation genannt (Shi *et al.* 1989). Später konnte gezeigt werden, dass die CD95/CD95L vermittelte Apoptose für den AICD die entscheidende Rolle spielt (Dhein *et al.* 1995, Ju *et al.* 1995, Brunner *et al.* 1995, Alderson *et al.* 1995). Nach Aktivierung von T-Zellen erfolgt zunächst die verstärkte Expression von CD95 und danach die Expression von CD95L. Während naive/ruhende und

frisch stimulierte T-Zellen trotz CD95 Expression eine Resistenz gegenüber CD95L vermittelter Apoptose aufweisen, werden T-Zellen nach wiederholter Antigenstimulation sensitiv für diesen Apoptoseweg (Klas *et al.* 1993, Krüger *et al.* 2003). Die Resistenz aktivierter T-Zellen in der frühen Phase der Stimulation ist auf eine reduzierte DISC-Formation bei gleichzeitig hoher Expression des anti-apoptotisch wirkenden Bcl-x<sub>L</sub> zurückzuführen. Memory T-Zellen hingegen scheinen durch die erhöhte Expression von FLIPs ((FLICE [= Caspase 8] Inhibiting Proteins) und der anti-apoptotischen Moleküle Bcl-2 bzw. Bcl-x<sub>L</sub> geschützt zu sein, wobei Cytokine wie IL-15 und Typ 1-Interferone eine wichtige Rolle spielen (Krüger *et al.* 2003).

Aktivierte T-Zellen in einem apoptosesensitiven Stadium vermitteln AICD sowohl autokrin durch Sekretion von löslichem CD95L, als auch parakrin durch löslichen und membranständigen CD95L (Dhein *et al.* 1995).

In eigenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass nach Aktivierung CD8<sup>+</sup> T-Zellen in CD4<sup>+</sup> T-Zellen CD95L-vermittelte Apoptose induzieren können und dieser Vorgang in Clustern aus CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen stattfindet (unveröffentlichte Daten).

Durch diese Mechanismen werden die Pool-Größe aktivierter T-Zell-Klone kontrolliert und Immunantworten reguliert (Lenardo *et al.* 1999). Alle Lymphozyten, einschließlich CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-, B- und Natürliche Killer (NK)-Zellen sowie ebenfalls dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen und Neutrophile sind Ziele der CD95/CD95L regulierten Immunhomöostase (Askenasy *et al.* 2005).

### **1.2.1.3 CD95L zur Inhibition alloantigen-spezifischer Immunantwort und GvHD**

Die zentrale Rolle, die CD95L in zellulären Vorgängen wie AICD, Immun-Privileg und Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen innehat, führte zu intensiven Bemühungen, das CD95/CD95L System zur gezielten Immunmodulation und Toleranzinduktion gegenüber Auto- und Transplantationsantigenen zu nützen.

Zur Prävention von GvHD bzw. zur Inhibition der allospezifischen Immunantwort wurden Antikörper gegen CD95 und CD95L zunächst in Studien mit murinen Zellen eingesetzt. Hartwig und Mitarbeiter (2002) zeigten eine Reduzierung der alloreaktiven Proliferation muriner T-Zellen *in vitro* um 50-90% durch kreuzvernetzten anti-CD95 mAK. Bei Einsatz allodepletierter Zellen in einem murinen GvHD-Modell konnte trotz inkompletter Allodepletion GvHD verhindert

werden. Ein ähnliches Ergebnis wurde im Mausmodell unter Einsatz von löslichem CD95L erzielt, hier wurde zusätzlich ein Erhalt der Graft-versus-Tumor-Aktivität beschrieben (Georgantas *et al.* 2006).

Die Daten, die aus den murinen Studien gewonnen wurden, eröffneten vielversprechende Anwendungsmöglichkeiten CD95L transfizierter Zellen für Immunmodulation und Organtransplantationen. Allerdings ist die Übertragbarkeit muriner Studien auf humane Systeme nur bedingt möglich: Es sind deutliche Unterschiede im Expressionsmuster von CD95 zwischen humanen und murinen Zellen beschrieben (Miyawaki *et al.* 1992). Auch die Sensitivität humaner Zellen gegenüber CD95L vermittelter Apoptose unterscheidet sich erheblich von der muriner Zellen: Während sich frisch isolierte humane T-Zellen resistent gegen löslichen CD95L zeigten, konnte in naiven murinen T-Zellen Apoptose induziert werden (Suda *et al.* 1996, 1997).

O'Flaherty und Mitarbeiter (1998) setzten anti-CD95-mAK (Klon DX2) oder konstitutiv CD95L exprimierende SW620 Colonicarcinom Zellen ein, um nach allogener Stimulation von humanen MNC mit alloenen EBV-B-Zellen Apoptose zu induzieren, wobei eine Inhibition der allospezifischen Proliferation um ca. 35% resultierte. In einem weiteren Ansatz mit humanen Zellen wurde CTLA4•FasL, ein chimäres Protein aus CTLA4 und CD95L, zu einer MLC aus humanen MNC gegeben, um durch Blockierung der Costimulation und gleichzeitiger Apoptoseinduktion allogene T-Zellen zu depletieren. Hierdurch konnte allospezifische Proliferation partiell inhibiert werden. (Dranitzki Elhalel *et al.* 2003, Huang *et al.* 2001). Versuche in unserer eigenen Gruppe, CD95 Antikörper zur Allodepletion *in vitro* einzusetzen, führten zu unbefriedigenden Ergebnissen und wurden nicht weiter verfolgt.

Für die Apoptoseinduktion durch membranständigen CD95L ist eine höhere Effektivität im Vergleich zu CD95 Antikörpern oder löslichem CD95L beschrieben (Suda *et al.* 1997, Tanaka *et al.* 1998, Hoves *et al.* 2004). Daher nutzten Dulat und Mitarbeiter (2001) CD95L exprimierende Zellen zur Reduktion allospezifischer Immunantwort. Die humane embryonale Nieren Zell-Linie 293 wurde mit humaner CD95L DNA transfiziert, um im alloenen Stimulationssystem Apoptose zu induzieren. Nach Kokultivierung humaner MNC mit CD95L exprimierenden 293 Zellen, konnte eine Reduktion der zytotoxischen Aktivität aktivierter T-Zellen beobachtet werden.

#### 1.2.1.4 Antgenspezifität der CD95L vermittelten Apoptose

Bezüglich der Frage, ob für die CD95L vermittelte Apoptoseinduktion eine antigenspezifische TCR-MHC Bindung durch die gleiche Zelle stattfinden muss oder ob alternativ aktivierte T-Zellen „unspezifisch“ durch CD95L exprimierende Zellen eliminiert werden können, gibt es widersprüchliche Aussagen. So gibt es Veröffentlichungen, in denen die Notwendigkeit von TCR und CD95 Stimulation durch die gleiche Zelle zur Apoptoseinduktion beschrieben ist (Lenardo *et al.* 1999, Strauß *et al.* 2007), während andere Gruppen „unspezifisch“ Apoptose induzieren konnten (Dulat *et al.* 2001, O’Flaherty *et al.* 1997, Lau *et al.* 1996) wobei weitere Berichte über die Apoptoseinduktion durch sogenannten „Bystander“-Zellen ebenso für eine unspezifische Wirkungsweise sprechen.

### 1.3 Regulatorische T-Zellen und GvHD

Während die Apoptoseinduktion durch CD95/CD95L einen wichtigen molekularen Mechanismus der Immunhomöostase darstellt, repräsentieren regulatorische T-Zellen eine entscheidende zelluläre Komponente der Immunregulation. Ihre Hauptaufgabe wird in der Hemmung und Verhütung überschießender oder fehlgeleiteter Immunreaktionen gesehen. Die modulierenden Eigenschaften regulatorischer T-Zellen führten zu Versuchen, überschießende Immunreaktionen und GvHD mit Hilfe dieser Zellen zu beeinflussen.

Die Regulation von Immunantworten durch Subpopulationen von T-Zellen wurde bereits in den 70er Jahren beschrieben: mehrere Gruppen berichteten von der Existenz sogenannter T-Suppressorzellen (Gershon *et al.* 1971, Kilshaw *et al.* 1975). Zwischenzeitlich in den Hintergrund gedrängt, gewann diese Idee in neuerer Zeit große Bedeutung, nachdem Suppressorzellen, nun als regulatorische T-Zellen bezeichnet, mittels Anwendung neuer Techniken nachgewiesen und selektiert werden konnten.

Es gibt verschiedene Arten regulatorischer Zellen: CD4<sup>+</sup> Regulatorische T-Zellen vom Typ1 (T<sub>R</sub>1) und T-Helfer 3 (T<sub>H</sub>3) Zellen wurden vor allem im Mukosa-assoziierten Immunsystem beschrieben (Faria und Weiner, 1999, Weiner 2001, Roncarolo *et al.* 2001). Auch für Natürliche Killer (NK), NK-T-, und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind regulatorische Eigenschaften beschrieben (Fillatreau *et al.* 2002, Wang *et al.* 2001, Roncarolo und Lewings 2000, Sakaguchi 2000, Cosmi *et al.* 2003, Zeng *et al.* 2004).



Eine zentrale Rolle kommt den CD4<sup>+</sup> regulatorischen T Zellen zu, welche konstitutiv CD25, die  $\alpha$ -Kette des Interleukin 2 Rezeptors, exprimieren. Im Tiermodell zeigten Hall und Mitarbeitern 1985 erstmals einen Einfluss dieser Zellen auf die Erzeugung von Transplantationstoleranz. Die zentrale Bedeutung dieser Zellen wurde anhand von Experimenten bewiesen, in denen gezeigt wurde, dass thymektomierte neugeborene Mäuse paradoxerweise ein Autoimmun-Syndrom entwickelten, was auf das Fehlen von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen zurückgeführt werden konnte (Sakaguchi *et al.* 1995, Asano *et al.* 1996).

### 1.3.1 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>)

Charakteristisch für CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen, im Folgenden als T<sub>reg</sub> bezeichnet, ist die Expression des Forkhead-Transkriptionsfaktors FoxP3. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen wurden zunächst in murinen Modellen untersucht. Sie inhibieren sowohl die Induktion als auch die Effektorfunktion autoreaktiver T-Zellen (Sakaguchi *et al.* 1995, Suri-Payer *et al.* 1998). Außerdem wurde gezeigt, dass sie in der Lage sind, Transplantatabstoßungsreaktionen und GvHD abzuschwächen oder sogar zu verhindern (Hoffmann *et al.* 2002, Taylor *et al.* 2002, Cohen *et al.* 2002, Edinger *et al.* 2003, Wood und Sakaguchi 2003, Trenado *et al.* 2003, 2004, Waldmann *et al.* 2004, Joffre *et al.* 2004, Hauben *et al.* 2005, Cohen und Salomon 2005, Salomon *et al.* 2006, Hoffmann und Edinger 2006). T<sub>reg</sub> werden im Thymus generiert und werden auch als *natürliche regulatorische T-Zellen* bezeichnet (Suri-Payer *et al.* 1998, Itoh *et al.* 1999, Fontenot *et al.* 2005). Darüberhinaus herrscht mittlerweile Einigkeit über eine thymusunabhängige Induktion von T<sub>reg</sub> aus CD25<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Peripherie (Curotto de Lafaille *et al.* 2004, Apostolou und v. Boehmer 2004, Kretschmer *et al.* 2005, Walker *et al.* 2005, Liang *et al.* 2005).

Es existieren verschiedenen Protokolle, murine und humane T<sub>reg</sub> *in vitro* nach Antigenstimulation oder/und Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 unter Zugabe von IL2 zur Expansion zu bringen (Levings *et al.* 2001, Hoffmann *et al.* 2004, Tang *et al.* 2004, Godfrey *et al.* 2004-2). Für eine mögliche klinische Anwendung ist die Generierung bzw. Anreicherung antigenspezifischer T<sub>reg</sub> von besonderer Bedeutung (s. Abschnitt 1.3.1.3.).

### 1.3.1.1 $T_{reg}$ – Linienspezifikation durch den Forkhead- Transkriptionsfaktor FoxP3

Auf der Suche nach einem Linienspezifischen Marker für  $T_{reg}$  war die Identifikation von Mutationen im FoxP3-Gen ein wichtiger Wegweiser. Diese wurden bei der sogenannten „*scurfy*“ Maus, sowie beim humanen Autoimmunsyndrom IPEX (für: Immundysregulation, Polyendokrinopathie, Enteropathie, X-linked) beobachtet (Brunkow *et al.* 2001, Wildin *et al.* 2001, Bennett *et al.* 2001, Fontenot und Rudensky, 2005). FoxP3 (Fox von *forkhead box*) gehört zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die eine sogenannte „*winged helix-forkhead*“ DNA-Bindungsdomäne aufweisen. Die Ähnlichkeit der Befunde bei „*scurfy*“ Mäusen und bei Mäusen, bei denen  $CD4^+CD25^+$ -T Zellen depletiert worden waren, führte zu Untersuchungen der FoxP3-Expression in  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen. Es zeigte sich, dass die Expression dieses Gens eng mit regulatorischen Funktionen assoziiert war. FoxP3 erwies sich dabei als essentiell für die Entwicklung und Funktion von  $T_{reg}$  (Hori *et al.* 2003, Fontenot *et al.* 2003, 2005, Gavin *et al.* 2007, Williams und Rudensky, 2007, Kim *et al.* 2007, Lahl *et al.* 2007). Darüberhinaus konnte durch Expression von FoxP3 in nicht regulatorischen T-Zellen Suppressoraktivität induziert werden (Fontenot *et al.* 2003, Hori *et al.* 2003, Khattri *et al.* 2003). FoxP3 scheint dabei für die Kontrolle von  $T_{reg}$ - assoziierten Genen wie CD25, CTLA-4 und GITR verantwortlich zu sein (Sakaguchi, 2005).

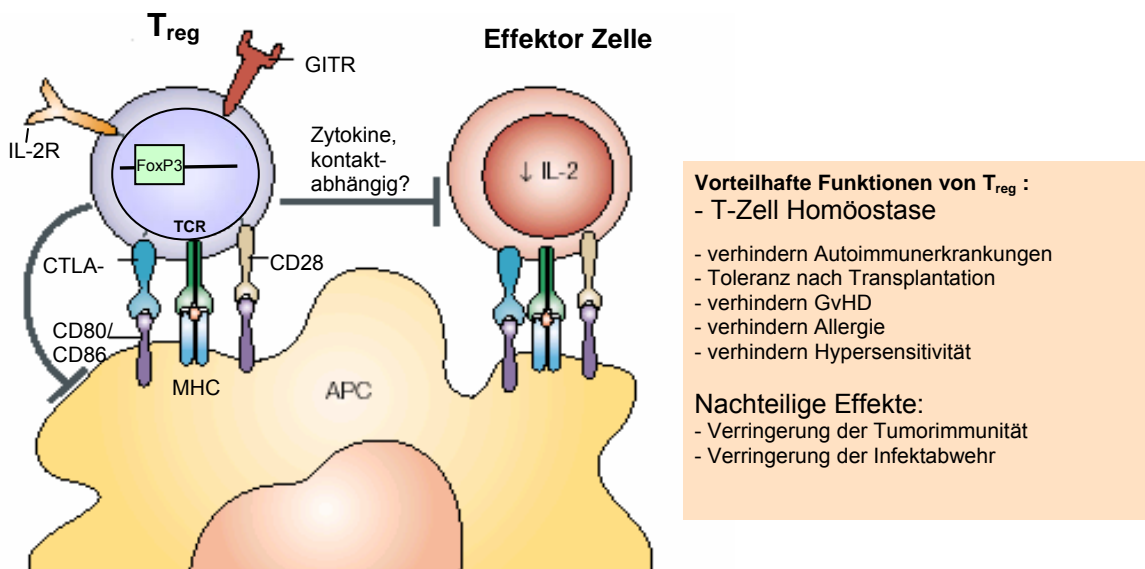
Eine ausschließlich linienspezifische Expression von FoxP3 auf murinen regulatorischen T-Zellen scheint jedoch für humane Zellen nicht zuzutreffen: Neben der konstitutiven Expression von FoxP3 auf humanen regulatorischen T-Zellen konnte der Transkriptionsfaktor auch nach Stimulation in  $CD4^+$  und/oder  $CD8^+$  T-Zellen nachgewiesen werden (Walker *et al.* 2003, Allan *et al.* 2005, Morgan *et al.* 2005, Gavin *et al.* 2006, Wang *et al.* 2007), ohne dass die Zellen dadurch unbedingt suppressorische Aktivität erhielten (Gavin *et al.* 2006, Wang *et al.* 2007). Während die FoxP3-Expression muriner T-Zellen bislang sowohl notwendig als auch hinreichend für die Definition von  $T_{reg}$  gilt, kann die FoxP3-Expression in humanen Zellen daher nicht absolut als linienspezifisch für  $T_{reg}$  gesehen werden.

### 1.3.1.2 Funktionelle Eigenschaften von $T_{reg}$

$T_{reg}$  inhibieren Effektor-T-Zellen sowohl direkt, als auch indirekt über die Inhibition von Antigen-präsentierenden Zellen. Die Suppression ist im

Allgemeinen zellkontakt-abhängig, die Beteiligung einer kontakt-unabhängigen Suppression über Cytokine wie TGF $\beta$  oder IL10 wird allerdings diskutiert (Abb. 1.3.).

T<sub>reg</sub> sind charakterisiert durch Anergie nach *in vitro*-Stimulation: sie proliferieren nicht nach TCR-Kreuzvernetzung und produzieren kein IL-2. Allerdings verhalten sich T<sub>reg</sub> *in vivo* anders und zeigen hier eine MHC Klasse II abhängige Proliferation (Fontenot und Rudensky 2005). Sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* wurde IL-2 als essentiell für die Aktivierung von T<sub>reg</sub> und die Beibehaltung der CD25-Expression nachgewiesen (Furtado *et al.* 2002, Thornton *et al.* 2004). *In vivo* vermittelt IL-2 eine Feedback-Kontrolle zwischen Effektor-T-Zellen und T<sub>reg</sub>: von Effektor-T-Zellen sezerniertes IL-2 aktiviert T<sub>reg</sub>, welche wiederum die IL-2 Produktion der Responder-T-Zellen inhibieren (Setoguchi *et al.* 2005). Physiologisch ist daher ein ausgewogenes Verhältnis von T<sub>reg</sub> und Effektor-T-Zellen von großer Bedeutung. Ein Ungleichgewicht in Richtung Effektor-T-Zellen kann überschießende Immunreaktionen und GvHD verursachen, andererseits kann ein T<sub>reg</sub> – Überhang zu einer generellen Immunsuppression führen, was eine abgeschwächte Infektions- bzw. Tumorerabwehr zur Folge hat (Wood und Sakaguchi 2003, Zeng *et al.* 2004, Boettler *et al.* 2005, Yamaguchi und Sakaguchi 2006, Orentas *et al.* 2006).

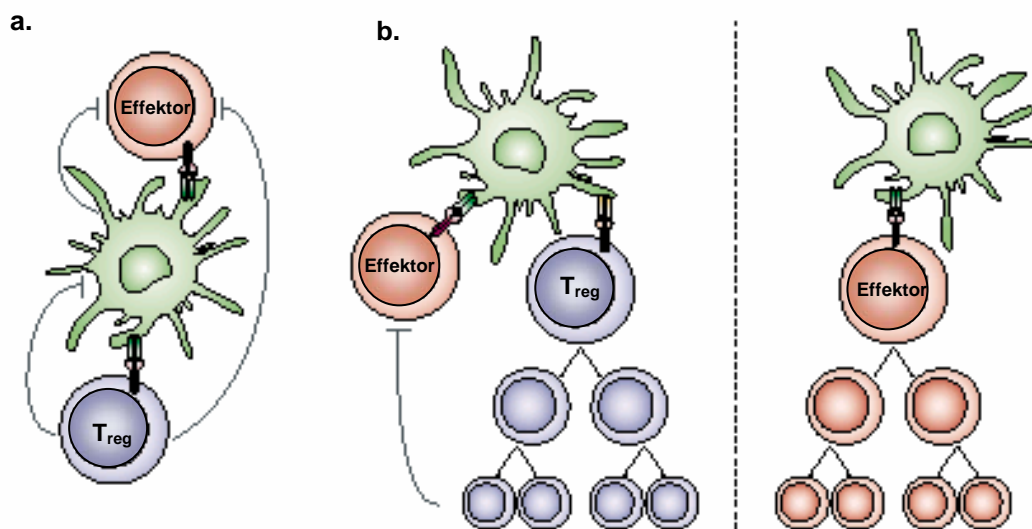


**Abb. 1.3. Potentieller Wirkungsmechanismus regulatorischer T-Zellen.** T<sub>reg</sub> vermitteln Suppression von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Effektor T-Zellen entweder direkt durch T<sub>reg</sub>-T-Zell Interaktionen oder indirekt über Antigen-präsentierende Zellen (APC). Die meisten *in vitro* Daten sprechen für die Beteiligung eines zellkontaktabhängigen Mechanismus, wobei der genaue Mechanismus nicht geklärt ist. *In vivo* sprechen Ergebnisse auch für eine zellkontakt-unabhängige Suppression durch Zytokine wie IL-10 und TGF $\beta$ . Die Aktivierung über den TCR und CTLA-4 steigert die T<sub>reg</sub>-Funktion, während die Signalübertragung durch GITR inhibierend wirkt. Modifiziert nach Wood und Sakaguchi, 2003.

### 1.3.1.3 Antigenpezifität von $T_{reg}$

Effektor-T-Zellen erkennen über den T-Zell-Rezeptor (TCR) spezifisch Peptid Antigene, die von MHC-Komplexen präsentiert werden (Abschnitt 1.1.2). Demgegenüber ist die Antigenpezifität von  $T_{reg}$  bislang nur unvollständig geklärt (Bach 2003, Belkaid und Rouse, 2005) (Abb. 1.4.).

Für eine potentielle klinische Anwendung nach haploidentischer HSCT ist diese Frage von Bedeutung. Geht man von einer generellen Suppression durch  $T_{reg}$  aus, so würde deren Verabreichung eine generelle Immunsuppression zur Folge haben – eine Situation, die konträr zu dem Ziel einer effektiven Immunrekonstitution stehen würde. Daher ist die Charakterisierung und Generierung bzw. Anreicherung antigenspezifischer  $T_{reg}$  ein favorisiertes Ziel aktueller Forschung (Martinic und v. Herrath, 2006, Jiang et al. 2006, Chang et al. 2006).



**Abb. 1.4. Modelle zur Antigenpezifität von  $T_{reg}$ .** a. Im Falle einer antigenspezifischen Regulation erkennen  $T_{reg}$  das gleiche Antigen wie  $CD4^+$  oder  $CD8^+$  Effektor T-Zellen, obwohl sie nicht unbedingt spezifisch für das gleiche Epitop sein müssen. b. Alternativ könnten  $T_{reg}$  mit Effektor T-Zellen für homöostatische Signale konkurrieren. So könnten Effektor T-Zellen nur in der Abwesenheit von regulatorischen T-Zellen proliferieren. In diesem Modell sind  $T_{reg}$  und Effektor T-Zellen nicht spezifisch für das gleiche Antigen. (Modifiziert nach Bach, 2003).

## **Zielsetzung der Arbeit**

Die Entwicklung einer GvHD stellt eine Hauptkomplikation nach allogener Stammzelltransplantation dar. Eine wichtige Strategie zur Vermeidung dieser Komplikation ist die Entfernung von T-Zellen aus dem Transplantat, was allerdings zu einer lang anhaltenden Immundefizienz nach Transplantation führt. Zur Überbrückung dieses Problems wäre die Übertragung von Spender-T-Zellen (Donor Lymphozyten Infusion, DLI) denkbar, die so aufgereinigt bzw. manipuliert sind, dass sie keine GvHD auslösen. Trotz intensiver Forschung vieler Arbeitsgruppen weltweit und deutlichen Fortschritten ist dies bislang nicht zuverlässig gelungen.

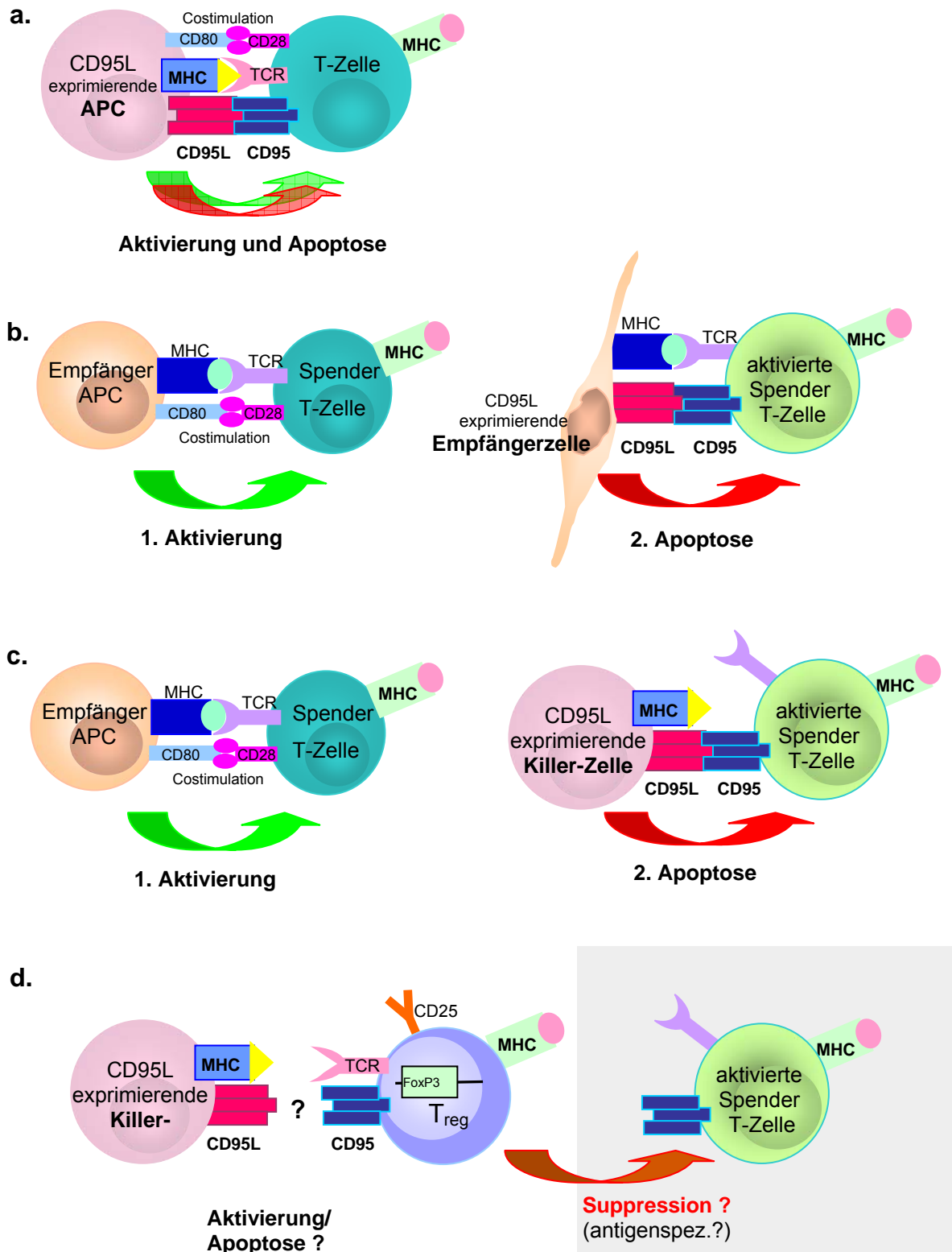
Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methode, humane alloreaktive T-Zellen selektiv mittels CD95L exprimierender Stimulatorzellen zu eliminieren.

Voraussetzungen hierfür sollten geschaffen werden durch die:

- Untersuchung der Apoptosesensitivität von T-Zellen in Allostimulationskulturen
- Etablierung geeigneter (apoptoseresistenter) Zellen zur Transfektion mit CD95L.

Schwerpunkte der Arbeit sollten sein:

- Die Etablierung und Untersuchung von Systemen zur Aktivierung und Apoptoseinduktion in alloreaktiven T-Zellen, wobei 3 verschiedene Modelle untersucht werden sollten (Abb. 1.5. a-c)
- Die Untersuchung von  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  T-Zellen innerhalb dieser Systeme (Abb. 1.5. d), da diese Zellen für die Kontrolle von GvHD von Bedeutung sind.



**Abb. 1.5. a-c Drei Modelle zur Apoptoseinduktion allogener aktivierter T-Zellen durch CD95L exprimierende Zellen.** a. Aktivierung und Apoptoseinduktion durch die gleichen, CD95L exprimierenden antigenpräsentierenden Zellen (APC). b. Aktivierung und Apoptoseinduktion sequentiell durch unterschiedliche, aber HLA-identische Zellen des gleichen Spenders. c. sequentielle Aktivierung und Apoptoseinduktion durch unterschiedliche, HLA nicht identische Zellen.

**d. Fragestellung  $T_{reg}$  in den Modellen zur Apoptoseinduktion.** Bleiben  $T_{reg}$  nach CD95L induzierter Apoptose erhalten? Supprimieren diese Zellen aktivierte T-Zellen? Ist diese Suppression antigenspezifisch?

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (Taufkirchen), AppliChem (Darmstadt) und Fluka (Neu-Ulm) verwendet.

#### 2.1.2 Materialien für die Isolierung, Kultivierung und Aufbewahrung von Zellen

Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
Dulbeccos Minimal Essential Medium (DMEM)	Gibco, Paisley, Schottland
Ficoll	Biochrom AG, Berlin
Fötales Kälberserum	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Glutamin	Gibco, Paisley, Schottland
Hepes	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Paisley, Schottland
Phosphate Buffered Saline Dulbeccos w/o Ca/Mg (PBS)	Biochrom AG, Berlin
RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Trypsin	Biochrom AG, Berlin

#### komplettes RPMI Medium

RPMI 1640	
FCS	10%
Penicillin	100U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Glutamin	2mM

#### komplettes DMEM Medium (Fibroblastenmedium)

DMEM	
FCS	10%
Penicillin	100U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

#### 2.1.3 Reagenzien für die Stimulation von T-Zellen

OKT3 (anti CD3)	CILAG, Sulzbach
anti-CD28	BD Biosciences, Heidelberg
Phythämagglutinin (PHA)	Gibco, Paisley, Schottland
Ionomycin	Sigma, Taufkirchen
Phorbol-Myristat-Acetat (PMA)	Sigma, Taufkirchen
Interleukin 2 (IL2)	PAN Biotech, Aidenbach

**2.1.4 Reagenzien für die Separation von Zellen**

anti-PE Microbeads  
RosetteSep® CD4 AB Cocktail

Miltenyi Biotec, Berg.-Gladbach  
CellSystems, St. Katharinen

MACS Puffer:

PBS  
0,5% BSA  
2mM EDTA

Serva, Heidelberg  
AppliChem, Darmstadt

**2.1.5 Reagenzien zur Apoptosedetektion**

Annexin V (PE und FITC konjugiert)

BioCat GmBH, Heidelberg

Annexin V Binding Puffer (ABP):

10mM Hepes/NaOH pH 7,4  
140mM NaCl  
5mM CaCl<sub>2</sub>

**2.1.6 Sonstige Zell-Kultur Materialien**

Metalloproteinase-Inhibitor (KB8301)  
Caspase-Inhibitor zVAD  
Mitomycin C  
CD95L-ELISA  
sFasL  
Fas:Fc Fusions Protein

Pharmingen, San Diego, USA  
Bachem, Weil am Rhein  
Sigma, Taufkirchen  
Merck, Darmstadt  
Alexis, Grünberg  
BD, Heidelberg

**2.1.7 Reagenzien zur Färbung, Markierung und Fixierung von Zellen**

Streptavidin-PE  
Calcein AM  
3-H Thymidin  
Paraformaldehyd reinst (PFA)  
Saponin von Quilaja Bark  
Methanol  
Ethanol  
Prolong Antifade Kit  
Octagam (Humanes Immunglobulin)  
EAS (enzymatic amplification staining)-Kit

Dako Diagnostika  
MoBiTec GmbH, Göttingen  
Amersham Biosciences, Freiburg  
Merck, Darmstadt  
Sigma, Taufkirchen  
Riedel-de Haen, Seelze  
Merck, Darmstadt  
MoBiTec GmbH, Göttingen  
Octapharma, Lachen, Schweiz  
Flow-Amp-Systems Ltd,  
Cleveland

**2.1.8 Antikörper**

Bei der Auflistung werden die humanen Antigene bezeichnet, gegen die die Antikörper gerichtet sind (z.B. CD3 für anti-CD3). Wenn nicht anders erwähnt, handelt es sich um Maus-Antikörper gegen humane Antigene.

Isotypkontrollen			Markierung	Bezugsquelle
Maus-IgG1			keine, FITC, PE	Dako
Maus-IgG1			PE-Cy5	BD
Maus-IgG1			Biotin	BD
Maus-IgG2a			PE-Cy5	BD
Maus-IgG3			keine	BD
Hamster-IgG			Biotin	Immunotech
Ratte-IgG			FITC, keine	BD



Spezifität	AK-Typ	Klon/ Name	Markierung	Bezugsquelle
CD3	IgG1	UCHT1	PE, PE-Cy5, FITC	Dako
CD4	IgG1	MT310	PE, PE-Cy5, FITC	Dako
CD4	IgG1	SK3	Biotin	BD
CD4	IgG2a	Edu-2	keine	MoBiTec
CD8	IgG1	DK25	PE, PE-Cy5, FITC	Dako
CD14	IgG2a	TÜK4	PE	Dako
CD16	IgG1	3G8	PE	Immunotech
CD19	IgG1	HD37	PE, FITC	Dako
CD20	IgG1	B-Ly1	PE, FITC	Dako
CD25	IgG1	ACT-1	PE, FITC	Dako
CD25	IgG1	2A3	APC	BD
CD25	IgG1	M-A251	PE-Cy5	BD
CD56	IgG1	MOC-1	PE	Dako
CD71	IgG1	Ber-T9	PE	Dako
CD71	IgG2a	M-A712	PE-Cy5	BD
CD95	IgG1	DX2	PE	BD
CD95	IgM	CH11	keine	Immunotech
CD95	IgG1	UB-2	FITC	Immunotech
CD95	IgG3	Apo-1	keine	laboreigen
CD95L	IgG1	Nok1	Biotin	BD
CD95L	IgG1	Nok1	keine, NA/LE	BD
CD95L	IgG1	G247	keine	BD
CD95L	IgG1	BR17	Biotin	Diaclone
CD95L	IgG Hamster	4H9	Biotin	Immunotech
CD95L	IgG1	5G5	keine	K. Schultze-Ostroff
CD95L	IgG2a Ratte	H11	FITC	Alexis
GITR	IgG1	110416	PE	RnD Systems
HLA-DR	IgG2a	G46-6	PE, PE-Cy5	BD
Sekundär-AK				
Ziege-anti-Maus-IgG			HRP	Santa-Cruz
Ziege-anti-Maus IgG2a			Alexa Fluor® 350	MoBiTec
Ziege-anti-Maus IgG			PE, FITC	Caltac
Ziege-anti-Maus Ig			Biotin	Dako
Kaninchen-anti-Ratte Ig			Biotin	Dako

**Tab. 2.1. Antikörper**

Firmen: DakoCytomation, Hamburg; BD Biosciences/Pharmingen, Heidelberg; Immunotech, Marseille, Frankreich; Diaclone, Besançon, Frankreich; RnD Systems, Wiesbaden; MoBiTec, Göttingen, Alexis, Grünberg; Santa Cruz, Heidelberg.

## 2.1.9 Zellen

### 2.1.9.1 Primäre Zellen

#### Mononukleäre Zellen (MNC)

wurden isoliert aus:

- peripherem Blut freiwilliger Spender (HLA typisiert)
- Buffy Coats freiwilliger Spender (DRK-Blutspendezentrale Ulm)
- Leukapheresepreparaten freiwilliger Spender (HLA typisiert) (DRK-Blutspendezentrale Ulm)

Nabelschnur MNC

wurden aus Nabelschnurblut gesunder Neugeborener der Universitätsfrauenklinik Ulm isoliert.

Fibroblasten

wurden aus der Hautbiopsie eines freiwilligen Spenders (HLA typisiert, s. Tab. 2.2. ) gewonnen.

**2.1.9.2 Zelllinien**EBV-B-Zelllinien

wurden aus peripheren B-Zellen freiwilliger Spender (HLA typisiert, s. Tab. 2.2.) generiert. Zur Transformation und Immortalisierung wurden MNC aus 15-20 ml Heparinblut isoliert und mit Epstein-Barr-Virus (EBV) – Überstand kultiviert.  $10 \times 10^6$  MNC wurden in 2,5 ml RPMI/10% FCS aufgenommen und mit 2,5 ml EBV-Überstand in 50ml Röhrchen für 2 Std bei 37°C (Wasserbad) inkubiert. Nach Zugabe von 5ml komplettem RPMI/5µg CSA (Cyclosporin A) wurde die Zellsuspension in eine 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche überführt und bei 37°C / 6,5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach ca. 2 Wochen konnten Zellaggregate im Invertoskop beobachtet werden. Je nach Wachstum wurde verbrauchtes Medium durch frisches ersetzt und die Zellen expandiert.

C1R- und C1R-A1

C1R Zellen wurden aus einer normalen EBV-B-Zelllinie (Licr.Lon.Hmy2, Edwards *et al.* 1982) gewonnen, indem nach γ-Bestrahlung eine Mutante selektioniert wurde (Storkus *et al.* 1987), die kein HLA-A, wenig HLA-B (HLA-B35 reduziert auf wenig Prozent der parentalen Expression, Zemmour *et al.* 1992) und normale Mengen an HLA-Cw4 exprimieren (s. Tabelle). C1R-A1 Zellen wurden durch Transfektion der C1R-Zellen mit HLA-A1 generiert (s. Tabelle). Die Zellen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. Wolfram Osen (DKFZ Heidelberg).

Zellen	HLA A	HLA B	HLA Cw
EBV-B 1	2, 28	14, 44	5, 8
EBV-B 2	2, 33	8, 57	3, 7
EBV-B 3	3, 3	35, 37	4, 6
Fibroblasten	3, 3	35, 37	4, 6
C1R	-	35 ↓ ↓	4
C1R-A1	1	35 ↓ ↓	4

**Tab. 2.2. HLA-Typ  
verwendeter  
B-Zell-Linien und  
Fibroblasten**

### Jurkat

Jurkat Zellen sind CD3 exprimierende T-Zellen, die ursprünglich von einem Patienten mit T-ALL stammen (Weiss A , *et al.*, 1984). Die Zellen zeichnen sich durch eine hohe Expression von CD95 und damit einer hohen Empfindlichkeit gegen CD95L vermittelte Apoptose aus.

### Jurkat-bcl2

Bcl 2 überexprimierende Jurkat-Zellen, die eine reduzierte Empfindlichkeit für CD95 vermittelte Apoptose aufweisen, wurden freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von PD Dr. Simone Fulda (Forschungslabor Kinderklinik Ulm).

### Jurkat Caspase 8-

Caspase 8 negative, apoptoseresistente Jurkat Zellen wurden freundlicher-weise zur Verfügung gestellt von PD Dr. Simone Fulda. (Juo *et al.* 1998).

## **2.1.10 Reagenzien und Puffer für molekularbiologische Methoden**

### **2.1.10.1 RNA-Isolierung und RT-PCR**

Rneasy Protect Mini Kit	Quiagen, Hilden
Superscript III RT-PCR Kit	Invitrogen, Karlsruhe
6x Ladepuffer	Fermentas, St. Leon-Rot
100bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Marker VIII	Roche, Mannheim

### TAE Puffer (10x):

Tris-HCl (pH 7,8)	500mM
Na-Acetat	200mM
EDTA	20mM

### **2.1.10.2 Klonierung und Transfektion**

Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
G418 (Genetecin)	Sigma, Taufkirchen
Puromycin	Clontech, CA, USA
pPUR Vector, pIRES puro 2	Clontech, CA, USA
Xba1	Gibco, Paisley, Schottland
Pvu I, EcoR1, EcoR2, Sca1	Roche, Mannheim
alkaline Phosphatase (Shrimp)	Roche, Mannheim
Rapid DNA Ligation Kit	Roche, Mannheim
Elongase Amplific. Syst.	Invitrogen, Karlsruhe
Endofree Plasmid Kit	Quiagen, Hilden
Qiaquick PCR-purification Kit	Quiagen, Hilden
Marker III	Roche, Mannheim
Marker IV	Roche, Mannheim
T4-DNA Ligase	Roche, Mannheim
Bacto-Agar	BD, Heidelberg
DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> kompetente Zellen	
(subcloning efficiency)	Gibco, Paisley, Schottland
Transfection Reagent Selector Kit	Quiagen, Hilden
Lipofectamine <sup>TM</sup> Reagent	Life Technologies, Karlsruhe

TBE Puffer (5x):

Tris-HCl, pH 8,3	500mM
Borsäure	500mM
EDTA	10mM

TE Puffer (10x):

Tris-HCl (pH 7,6)	0,1M
EDTA	10mM

LB (Luria-Bertani) Medium (5x) (autoklaviert):

Trypton	50g
Hefeextrakt	25g
NaCl	25g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000ml

pH auf 7,0 eingestellt

LB-Amp Medium

LB Medium + 50 µg/ml Ampicillin (nach Autoklavierung und Abkühlung zugegeben)

LB Agar (autoklaviert):

32g Bacto-Agar  
in 1000ml LB Medium

LB-Amp Agar

Nach Autoklavierung auf 50°C abgekühlt  
+ 50 µg/ml Ampicillin

SOC medium

Trypton	20g
Hefeextrakt	5g
NaCl	0.5g
1M KCl	2.5ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

pH auf 7,0 eingestellt mit 10N NaOH, Autoklavierung, 20 ml sterile Glucose (1M) direkt vor Gebrauch zugegeben

### 2.1.10.3 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von Biomers.net GmbH, Ulm synthetisiert. Alle Sequenzen sind in 5'→3' Leserichtung angegeben.

Primer für die Umklonierung von hFL D4 (CD95L mit deletierter Shedding-Stelle)

5'-Primer GCG **CGA ATT** CCT ACA GGA CTG AGA AGA AGT

3'-Primer GCG **CGA ATT** CAC ATT CTC GGT GCC TGT AAC

grau hervorgehoben: EcoR1 Erkennungssequenz

Primer für den Nachweis von FoxP3

5'-Primer CAC AAC ATG CGA CCC CCT TTC ACC TAC

3'-Primer GCA GGC AAG ACA GTG GAA ACC TCA CTT C

Länge des RT-PCR Fragmentes: 431 bp

Primer für den Nachweis von GAPDH

5'-Primer ACG GAT TTG GTC GTA TTG GGC G

3'-Primer CTC CTG GAA GAT GGT GAT GG

Länge des RT-PCR Fragmentes: 200 bp

#### 2.1.10.4 Vektoren und Konstrukte

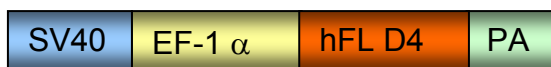
Alle verwendeten Vektoren enthielten ein Ampicillin-Resistenzgen für die Selektion transformierter Bakterien.

##### Selektionsvektor pPur (Clontech, CA, USA)



pPur ist ein Selektionsplasmid, das unter dem Promotor des Simian Virus 40 (SV40) eine Puromycinresistenz auf eukaryotische Zellen überträgt, so dass pPur für die Selektion stabil transformierter Zell-Linien verwendet werden kann. Das Plasmid wird hierzu mit einem anderen Vektor, der das gewünschte Gen enthält, kotransfiziert.

##### Konstrukt pEF-hFL D4 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S.Nagata)



Die CD95L DNA (hFL D4: humaner Fas Ligand, Klon D4), die für dieses Konstrukt verwendet wurde ist an der Reaktionsstelle für Metalloproteinasen (cleaving-site) deletiert, so dass das Molekül nach Expression nicht mehr von der Zelloberfläche abgespalten werden kann. Die DNA ist in die Xba1-Stelle des pEF-BOS Vektors (S. Mizushima und S. Nagata, Nuc. Acids Res., 18: 5322, 1990) einkloniert.

Für die für Transfektionen benötigte Vektorkontrolle wurde die hFL D4 DNA mittels Xba1-Restriktionsverdau (s.2.3.5.) aus dem Konstrukt herausgeschnitten und der Vektor religiert (s. auch 2.3.11).

##### Konstrukt hFL-D4-pIRESpuro2



Um zu garantieren, dass alle puromycinresistenten Zellen nach der Transfektion auch die gewünschte CD95L DNA enthalten, wurde die hFL D4 DNA in den pIRESpuro2 Vektor (Clontech, CA, USA) subkloniert. Dieser Vektor enthält den immediate early promotor aus dem humanen Cytomegalievirus (CMV), die interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES) aus dem Encephalomyocarditisvirus (ECMV) und ein Gen für die Kodierung der Puromycinresistenz (puromycin-N-acetyl-transferase).

#### 2.1.11 Geräte und sonstige Materialien

Brutschränke  
Einmalkanülen  
Einfrierröhrchen  
Einmalfilter  
Einmalpipetten  
Einmalspritzen  
Elektroporations System: Gene Pulser II  
Elektroporationsküvetten  
Elisa-Reader  
Filter für Harvester  
Gelapparaturen für Agarosegele  
Glaswaren

Heraeus, Hanau  
Braun, Melsungen  
Nunc/Nalgene, Rochester, NY, USA  
Nalgene, Rochester, NY, USA  
Corning/Costar, NY, USA  
Codan med. ApS, Rodby, DK  
Bio-Rad, München  
Bio Rad, München  
BioTek Instruments, Vermont, USA  
Wallac, Turku, Finnland  
Appligene, Illkirch, Frankreich  
Merck, Darmstadt

Laminar-Air Flow Bank	Heraeus, Hanau
Magnetrührer	Heidolph, Kelheim
Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Microzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Multipipette	Brand, Wertheim
pH Meter	WTW, Weilheim
Photometer	Pharmacia Biotech (Amersham)
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Plastikwaren für die Zellkultur	Greiner, Frickenhausen
	BD Biosciences, Heidelberg
	Eppendorf, Hamburg
Power Supply (Spannungsgeräte)	Pharmacia-Biotech (Amersham)
Quiagen Säulen	Quiagen, Hilden
Schüttelinkubator	Edmund Bühler GmbH, Tübingen
Top count Szintillationszähler	Packard, Dreieich
Vortex	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waagen	Sartorius, Göttingen;
	Mettler-Toledo, Schweiz
Wasserbäder	Köttermann, Uetze/Hänigsen
	GFL, Münster
Zell-Harvester	Inotech, Dottikon, Schweiz
Zentrifuge	Heraeus, Hanau
<u>Durchflußzytometrie:</u>	
Coulter Epics XL	Coulter, Krefeld
FacsCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
Cytometerröhrchen	WICOM, Heppenheim
<u>Mikroskopie:</u>	
Phasenkontrastmikroskop	Carl Zeiss Ag, Oberkochen
Invertoskop	Carl Zeiss Ag, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop: Olympus AX70	Olympus Optical, Hamburg
Objektträger	Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
	BD Biosciences, Heidelberg
Kulturobjektträger	
<u>Magnetseparatoren:</u>	
Vario-MACS	Milteny Biotec, Berg. Gladbach
Midi-MACS	Milteny Biotec, Berg. Gladbach
Separationssäulen (LD und LS)	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach

## 2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 6,5% CO<sub>2</sub> in komplettem Kulturmedium (s. Material Abschnitt 2.1.2) kultiviert. FCS wurde generell für 45 Min. bei 56°C komplement-inaktiviert. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden Zellen aus Suspensionskulturen oder frisch trypsinisierte Zellen im Volumenverhältnis 1:2 mit Trypanblau-Lösung (0,125%) gemischt. Zellen wurden, wenn nicht anders erwähnt durch Zentrifugation (5 Min.; 1400 U/min, 421g) sedimentiert.

### **2.2.2 Isolierung mononukleärer Zellen (mononuclear cells, MNC)**

MNC wurden entweder aus peripherem Blut, Buffy Coats (BC), Leukapheresepreparaten oder Nabelschnurblut nach Standardverfahren über einen Dichtegradienten (Ficoll, Dichte 1,077g/ml) isoliert. Blut wurde hierzu mit PBS im Verhältnis 1:1, Buffy Coats und Leukapheresepreparate im Verhältnis 1:5 verdünnt und 35 ml über 15 ml (50 ml Röhrchen), bzw. 10 ml über 5 ml (15 ml Röhrchen) Ficoll geschichtet. Nach Zentrifugation (25 Min. bei 1370 U/min, 400 G) wurde die Interphase aus mononukleären Zellen abgehoben und in PBS gewaschen (10 Min. bei 1800 U/min). Um die Thrombozyten zu entfernen wurden die Zellen für 10 Minuten bei 800 U/min (140 G) zentrifugiert. Die Zellzahl wurde durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer, die Viabilität mittels Trypanblaufärbung bestimmt.

### **2.2.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen**

Nach der Zentrifugation von maximal  $5 \times 10^7$  Zellen (5 Min. bei 1400 U/min) wurden diese in 1 ml FCS/10% DMSO (Einfriermedium) resuspendiert und rasch bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Bei einer höheren Zellzahl wurde entsprechend mehr Einfriermedium verwendet. Zur endgültigen Lagerung wurden die Zellen frühestens 24h nach dem Einfrieren in flüssigen Stickstoff ( $-196^\circ\text{C}$ ) überführt. Zum Auftauen wurden die Einfrierampullen direkt nach der Entnahme aus dem Stickstofftank in ein  $37^\circ\text{C}$  warmes Wasserbad gestellt. Die angetaute Zellsuspension wurde in größere Zentrifugationsröhrchen überführt, wo sie mit kompletten RPMI Medium (bei Fibroblasten DMEM Medium) im Verhältnis 1:10 gemischt wurden. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in PBS gewaschen, anschließend in Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

### **2.2.4 Produktion von „Feeder-Zellen“ bzw. 3<sup>rd</sup>-party Zellen**

MNC aus 5 verschiedenen Buffy coats wurden isoliert und zur Inhibierung der Proliferation jeweils mit 20 Gy bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen gepoolt und in Konzentrationen von  $5-20 \times 10^6$  / Ampulle kryokonserviert. Je nach Anwendung wurden so gewonnene und aufbereitete Zellen als Feeder- oder als 3<sup>rd</sup>-party Zellen bezeichnet. Feeder-Zellen (Accessory-cells) dienen der Produktion von Zytokinen und wurden in Langzeit Stimulationskulturen mit PHA verwendet (s. 2.2.6.1.). 3<sup>rd</sup>-party Zellen repräsentieren einen Pool unterschiedlicher Allo-Antigene und wurden zur allogenen Stimulation verwendet (s. 2.2.6.4.).

### **2.2.5 Kultivierung von lymphatischen Zelllinien (EBV-B, Jurkat, Jurkat Caspase 8-, Jurkat-bcl2, C1R, C1R-A1)**

Alle verwendeten lymphatischen Zelllinien wuchsen als Suspensionszellen mit Ausnahme von semiadherenten C1R-Zellen. Bis zu  $15 \times 10^6$  Zellen wurden in  $25 \text{ cm}^2$ , bis zu  $60 \times 10^6$  Zellen in  $75 \text{ cm}^2$ , höhere Zellmengen in  $150 \text{ cm}^2$  Kulturflaschen gehalten. Die Zellen wurden in komplettem RPMI Medium in einer Konzentration von  $1-2 \times 10^6$ / ml kultiviert. 2x pro Woche wurde das Medium gewechselt, hierzu wurden die Suspensionskulturen nach Abnahme des verbrauchten Mediums so verdünnt, dass die ursprüngliche Zellkonzentration von  $1-2 \times 10^6$ / ml erreicht wurde. C1R- und C1R-A1 Zellen wurden nach Abnahme des verbrauchten Mediums von der Kulturflaschenwand geklopft und gespült und anschließend wie oben verdünnt.

### **2.2.6 Kultivierung von Fibroblasten**

Humane Fibroblasten wurden aus einer Hautbiopsie gewonnen, indem das Biopsat in eine runde Kulturschale ( $\varnothing 100 \text{ mm}$ ) mit zunächst wenig Fibroblastenmedium überführt und mit einem Skalpell zerkleinert wurde. Nach Auffüllen der Schale mit 10 ml Fibroblastenmedium erfolgte die Kultivierung bei  $37^\circ \text{C}$ . Die Fibroblasten adhärten um die Biopsate am Boden der Kulturschale und proliferierten von dort aus. Zur Expansion wurden die Zellen nach Konfluenz mit Trypsin oder Accutase abgelöst (5-10 Min. Inkubation bei  $37^\circ \text{C}$ , mikroskopische Kontrolle), mit PBS gewaschen und in der doppelten Menge des ursprünglichen Mediums (20 ml) aufgenommen. Jeweils 10 ml mit ca.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden in  $25 \text{ cm}^2$  Kulturflaschen ausgesät. Einmal pro Woche wurde das Medium gegen frisches ausgetauscht. Bei konfluenter Bewachung konnten die Zellen expandiert werden. Jeweils ein Teil der Zellen wurde regelmäßig kryokonserviert, um später darauf zurückgreifen zu können. Eine kontinuierliche Expansion war bis zu 12 Wochen nach Aussäen der Zellen (Biopsieentnahme) möglich, danach wurden alle Zellen eingefroren und für Experimente gezielt wieder aufgetaut. Nach dem Auftauen proliferierten die Zellen noch über ca. 8 Wochen weiter und stellten dann die Proliferation ein.

### **2.2.7 Kultivierung und Stimulation primärer lymphatischer Zellen**

Primäre lymphatische Zellen können nicht ohne Stimulation über längere Zeit in Kultur gehalten werden. Die nachfolgend im Detail aufgeführten Stimulationsmethoden dienten zur Expansion von T-Zellen bzw. zur



Untersuchung aktivierter T-Zellen. Prinzipiell wurden die Zellen während der Stimulation in komplettem RPMI Medium in einer Konzentration von  $1-2 \times 10^6$ /ml kultiviert.

### 2.2.7.1 Stimulation mit Phythämagglutinin (PHA)

Das polyklonale Mitogen PHA ist ein Glykoprotein, das aus der Gartenbohne *Phaseolus vulgaris* gewonnen wird. Für die Stimulation mit PHA wurden MNC anfangs in einer Konzentration von  $1,5 \times 10^6$  / 2 ml / Vertiefung in einer 24 well Kulturplatte ausgesät. Dem Medium wurden 0,5% PHA und 100iE IL2 / ml hinzugefügt. Zweimal pro Woche wurde die Hälfte des Mediums durch frisches Medium/PHA/IL2 ersetzt. Zur Expansion wurden die PHA-Blasten in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ ml in Zellkulturflaschen umgesetzt. Für die Proliferation nach PHA-Stimulation werden sogenannte Feeder-Zellen (accessory-cells) benötigt, die u.a. über eine Verstärkung der IL-2-Rezeptor Expression wirken (Oudrhiri *et.al.* 1985). Accessory-cells (B-Zellen, Monozyten) sind zu Beginn der Kultur in den MNC vorhanden. Da diese Zellen nicht proliferieren, wurden während der Stimulationskultur einmal pro Woche bestrahlte Feeder-Zellen (s. 2.2.4) in einer Konzentration von 1:1 zugegeben.

### 2.2.7.2 Stimulation mit gebundenem anti-CD3 (OKT3)

Physiologisch erfolgt die Aktivierung von T-Zellen über den T-Zellrezeptor (TCR), der mit dem CD3 Molekül assoziiert ist und costimulatorischen Molekülen. Durch Kreuzvernetzung der CD3 Moleküle mit an Kunststoffplatten gebundenem anti-CD3 (OKT3) lassen sich T-Zellen auch ohne Costimulation *in vitro* stimulieren. Hierzu wurden die Kulturplatten vor dem Aussäen der Zellen mit 1 µg/ ml OKT3 in PBS für 2h bei 37°C inkubiert und anschließend 2x mit PBS gewaschen. Nach der Bindung von OKT3 an die Kunststoffplatten wurden  $1 \times 10^6$  MNC/ ml in komplettem RPMI + 100iE IL2/ ml ausgesät. Zur Expansion wurden die Zellen 1x/Woche in frisch mit OKT3 gebundene Platten umgesetzt und mit neuem Medium/IL2 auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$ / ml verdünnt. Einmal pro Woche wurde die Hälfte des verbrauchten Mediums durch frisches ersetzt.

### 2.2.7.3 Stimulation mit löslichem anti-CD3 (OKT3) und anti-CD28

Proliferation von T-Zellen durch lösliches anti-CD3 kann nur in Verbindung mit der Aktivierung des costimulatorischen Moleküls CD28 erreicht werden. OKT3 und anti-CD28 wurden in einer Konzentration von je 0,5 µg/ ml in komplettem

RPML + 100iE IL2/ ml eingesetzt. Das verbrauchte Medium wurde 2x/Woche durch frisches Medium/IL2/OKT3/CD28 ersetzt.

### **2.2.7.4 Stimulation mit allo genen Zellen in der gemischten Lymphozyten-kultur (mixed lymphocyte culture, MLC)**

Als allogene Stimuli für T-Zellen (Responderzellen) wurden entweder HLA-differente MNC, T-Zellen, 3<sup>rd</sup>-party Zellen (s.2.2.4) oder B-Zellen (Zell-Linien: EBV-B-Zellen und C1R-A1-Zellen) verwendet. Allogene Stimulatorzellen wurden zur Proliferationshemmung entweder mit 20 Gy (primäre MNC, T-Zellen) bzw. 40 Gy (B-Zell-Linien) bestrahlt oder für 1 Std. bei 37°C mit 50 µg/ml/ 10<sup>7</sup> Zellen Mitomycin C behandelt. T-Zellen und MNC wurden in einer Konzentration von 1:1, B-Zellen in einer Konzentration von 1:2 Stimulator/Responder eingesetzt. Die Gesamtkonzentration der Zellen in komplettem RPML betrug 1x10<sup>6</sup>/ ml. Nach 5 Tagen erfolgte in der Regel die Restimulation mit frischen Stimulatorzellen. Verbrauchtes Medium wurde 2x/ Woche ausgetauscht.

### **2.2.7.5 Stimulation für die Induktion von Oberflächen-CD95L auf T-Zellen**

Der Nachweis von membrangebundenem CD95L sollte auf der Zelloberfläche von aktivierten T-Zellen etabliert werden. Hierzu wurde ein Stimulationsprotokoll etabliert, mit dem der Nachweis reproduzierbar gelang: Primär wurden die Zellen durch eine der vier oben genannten Stimulationsmethoden (2.2.6.1.-2.2.6.4) stimuliert. Die Aktivierung erfolgte optimalerweise über einen Zeitraum von > 14 Tagen. Zur Mobilisierung von CD95L auf die Zelloberfläche wurde entweder mit einer Kombination aus Ionomycin (0,5µg/ml) und PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Azetat) (10ng/ml) oder mit Ionomycin alleine in einer Konzentration von 1µg/ml für 20h bei 37°C stimuliert. Zur Vermeidung der Abspaltung von CD95L von der Zelloberfläche wurde der Metalloproteinaseinhibitor KB8301 (BD-Pharmingen) (1µl/ml) für die gesamte 2. Stimulationsdauer von 20h zugefügt. Zur Reduktion der Apoptoserate wurde in einigen Experimenten der Pancaspaseinhibitor zVAD (Z-Val-Ala-DL-Asp-Fluoromethylketon) in einer Konzentration von 50µmol 1-2h vor der PMA/Ionomycin bzw. Ionomycinstimulation zugegeben.

### **2.2.8 Stimulation und Apoptoseinduktion mit CD95L exprimierenden C1R-A1 Zellen im simultanen Kultursystem**

Bei Kokultivierung von MNC mit CD95L exprimierenden C1R-A1 Zellen wurde ein steigender Anteil von CD56<sup>+</sup>NK Zellen (bis zu 50%) beobachtet. Diese Zellen waren offenbar CD95L resistent und zeigten nach Kultur unverminderte zytotoxische Aktivität. Um ein Auswachsen dieser CD95L-resistenter NK-Zellen zu verhindern wurde zur Apoptoseinduktion mit CD95L ausschließlich mit CD56 depletierten (CD56<sup>-</sup>) MNC gearbeitet. Die CD56 Depletion erfolgte wie unter 2.2.10.2. beschrieben.

Weiterhin beeinträchtigt ionisierende Strahlung die Expression und die biologische Aktivität von CD95L (Albanese *et al.* 2000 und eigene, nicht gezeigte Experimente), so dass für die Kokulturen nicht bestrahlte, sondern Mitomycin C-behandelte C1R-A1-CD95L bzw. C1R-A1-GFP Zellen verwendet wurden.

CD56<sup>-</sup> MNC wurden im Verhältnis 2:1 mit Mitomycin C-behandelten (s. 2.2.6.4) C1R-A1-CD95L für 5 Tage kokultiviert. Viable T-Zellen wurden von apoptotischen Zellen und B-Zellen mittels magnetischer Depletion Annexin V- und CD19- positiver Zellen getrennt (2.2.10.2.) und für funktionelle Analysen verwendet.

### **2.2.9 Apoptoseinduktion in allogenen aktivierten T-Zellen mit CD95L-exprimierenden Zellen (C1R/C1R-A1 oder Fibroblasten) im sequentiellen Kultursystem**

CD56 depletierte (CD56<sup>-</sup>) MNC wurden für 5 Tage mit HLA-differenten EBV-B-Zellen stimuliert wie unter 2.2.6.4. beschrieben und viable MNC (>95% T-Zellen) über einen Dichtegradienten mit Ficoll (2.2.9.4.) isoliert.

Zur Apoptoseinduktion mit CD95L-exprimierenden C1R- bzw. C1R-A1-Zellen (Mitomycin C- behandelt, s. 2.2.6.4.) wurden allostimulierte T-Zellen und C1R/C1R-A1-CD95L im Verhältnis 2:1 für 3 Tage kokultiviert.

Zur Apoptoseinduktion mit CD95L exprimierenden Fibroblasten wurden  $10 \times 10^6$  der allostimulierten T-Zellen in einer zu 60-70% mit Fibroblasten-CD95L bewachsenen 75cm<sup>2</sup> Kulturflasche (ca.  $0,5 \times 10^6$  Zellen) kultiviert.

### 2.2.10 Anreicherungsverfahren

#### 2.2.10.1 MACS® (Magnetic absorbant cell separation)

Das Prinzip der magnetischen Anreicherung besteht darin, dass Antikörper, an die magnetischen Partikel gekoppelt sind, spezifisch an Antigene einer definierten Zellpopulation in einem Zellgemisch binden. Diese kann dann mithilfe eines Magneten aus dem Gemisch separiert werden. Ist das Ziel die Entfernung der gebundenen Zellpopulation, spricht man von Negativselektion, ist die gebundene Fraktion die Zielpopulation, spricht man von Positivselektion.

Für die MACS® Separation wurden Säulen verwendet, deren kunststoffbeschichtete, ferromagnetische Fasern im Feld eines starken Permanentmagneten ebenfalls magnetisch werden.

MACS® wurde zur Positivselektion und Negativselektion von CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> Zellen, zur Positivselektion von CD25<sup>+</sup> Zellen, zur Negativselektion von CD25<sup>-</sup> Zellen und zur Entfernung apoptotischer Zellen, CD56<sup>+</sup> Zellen und Erythrozyten verwendet. In Tab. 2.3. sind die verwendeten Antikörper für die jeweilige Methode im Detail aufgelistet.

Nach dem Waschen in PBS wurden bis zu  $50 \times 10^6$  Zellen in 500 µl bzw. bis  $250 \times 10^6$  Zellen in 1000 µl PBS in einem 50 ml Röhrchen aufgenommen. Für die Blockierung unspezifischer Bindungen wurden die Zellen für 5 Min. mit humanem IgG (Oktagam) in einer Konzentration von 1:10 inkubiert. PE konjugierte Antikörper wurden in einer Konzentration von 1 µg/100 µl eingesetzt, bei Antikörpermischungen wurde jeder einzelne Antikörper in dieser Konzentration eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei RT lichtgeschützt für 15 Minuten. Die Zellen wurden anschließend in 50 ml MACS®-Puffer gewaschen und in 500 bzw. 1000 µl MACS®-Puffer aufgenommen. In einem zweiten Schritt wurden 100 bzw. 200 µl Anti-PE-MACS® Beads zugegeben, die sich dann an die PE-konjugierten Antikörper hefteten. Nach weiteren 15 Minuten lichtgeschützter Inkubation bei RT, erfolgte die Auftrennung der beladenen von unbeladenen Zellen mittels einer LD (Negativselektion) bzw. LS (Positivselektion) Separationssäule am Vario-MACS® Magneten. Die Negativfraktion wurde unter mehrfachen Waschen der Säule gesammelt. Die Positivfraktion wurde nach dem Waschen gewonnen, indem die Säule aus dem Magnetfeld genommen und die gebundenen Zellen unter vorsichtigem Druck herausgelöst wurden. Die Reinheit der Zellpopulationen (95-99%) wurde durch Kontrolle der PE-positiven Fraktionen und evtl. Zusatzfärbungen der Zellen

durchflußzytometrisch kontrolliert und bei Bedarf die Passage durch die Säule noch einmal wiederholt.

	Ausgangs-population	selektionierte Population	verwendete PE-konj. AK/Reag.	verwendete Fraktion
<b>Positivselektion</b>	MNC	CD4 <sup>+</sup>	anti-CD4	Positivfraktion
	MNC	CD8 <sup>+</sup>	anti-CD8	Positivfraktion
	CD4 <sup>+</sup>	CD25 <sup>+</sup>	anti-CD25	Positivfraktion
<b>Negativselektion</b>	MNC	CD4 <sup>+</sup>	anti- CD8, 14, 15, 16, 56, 19, 20, HLA-DR	Negativfraktion
	MNC	CD8 <sup>+</sup>	anti- CD4,14, 15, 16, 56, 19, 20, HLA-DR	Negativfraktion
	CD4 <sup>+</sup>	CD25 <sup>+</sup>	anti-CD25	Negativfraktion
<b>Entfernung einer defin. Population</b>	MNC	CD56 <sup>+</sup>	anti-CD56	Negativfraktion
	MNC	Erythrozyten	Glycophorin	Negativfraktion
	aktivierte T-Zellen	Tote/ Apoptotische Zellen	Annexin V	Negativfraktion
	C1R-A1	CD95 <sup>+</sup>	anti-CD95 (Klon Apo1)	Negativfraktion

Tab. 2.3. MACS-Selektion, Populationen, Selektionsmethode und Antikörper

### 2.2.10.2 Rosettierung und Dichtegradient (Rosette-Sep™)

Die Rosette-Sep™ Methode hat den Vorteil, dass keine mononukleäre Zellen isoliert werden müssen, um eine magnetische Separation anzuschließen, sondern dass direkt aus einem Vollblut-/ Buffy Coat-/ Leukapherese-Präparat die gewünschte Population separiert werden kann. Hierbei werden tetramere Antikörper-Komplexe verwendet, die zum einen an ungewünschte Zellen binden und zum anderen über Glycophorin A an Erythrozyten. So kommt es zur Rosettierung der nicht benötigten Zellen mit den Erythrozyten. Durch Zentrifugation über einen Ficoll-Dichtegradienten pellettieren die rosettierten Zellen, während die gewünschte Population aus der Interphase isoliert werden kann. Zur Anreicherung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Buffy Coats bzw. aus Leukapherese-Präparaten wurde der CD4<sup>+</sup>-T-Zell RosetteSep™ Antikörper-Cocktail der Firma CellSystems nach Angaben des Herstellers verwendet. Buffy Coats (ca.  $1 \times 10^9$  Zellen) wurden mit 5 ml, Leukapherese-Zellen ( $3 \times 10^9$ ) mit 15 ml Rosette-Sep Antikörper-Cocktail gemischt und nach 20 minütiger Inkubation bei RT vor der Schichtung auf Ficoll mit PBS 1:4 (BC-Zellen) bzw. 1:6 (Leukapherese-Zellen) verdünnt. Die Reinheit der Anreicherung betrug zwischen 90-97%.

### 2.2.10.3 Dichtegradient (Ficoll) zur Anreicherung lebender Zellen

Zur Anreicherung lebender Zellen aus Zellkulturen oder nach Kryokonservierung wurden diese direkt aus der Kultur bzw. nach dem Auftauen über Ficoll geschichtet und zentrifugiert, wie unter 2.2.2. beschrieben. Durch die Dichtegradientenzentrifugation wurden tote Zellen pelletiert, während lebende Zellen aus der Interphase isoliert werden konnten. Nach einmaligem Waschen in PBS wurden die Zellen zur Weiterverwendung in Kulturmedium aufgenommen.

### 2.2.11 Durchflußzytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting) eignet sich zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen auf Einzelzelebene. Grundlage ist die Markierung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern/Reagenzien gegen definierte Antigene/Moleküle. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension nacheinander an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße (Vorwärtsstreuung, Forwardscatter, FSC) und die Granularität des Zytoplasmas (Seitwärtsstreuung, Sidescatter, SSC) gewonnen. Eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, weil sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen. Durch das „Gaten“ können in der Durchflußzytometrie Analysen auf definierte Zellpopulationen begrenzt werden. Gates können sowohl in der Streulichtanalyse als auch in der

Fluoreszenzanalyse gesetzt werden, indem man die relevanten Regionen in der Graphik markiert.

### **2.2.11.1 Charakterisierung von Zellen anhand ihrer Größe und Granularität**

Durch die Analyse der Streulicht-Messergebnisse und ihrer graphischen Darstellung ließen sich Zellen ohne Fluoreszenzmarkierung bereits anhand ihrer Größe und Granularität unterscheiden. Dabei wurde auf der x-Achse das Vorwärtsstreulicht (FSC) und auf der y-Achse das Seitwärtsstreulicht (SSC) in einer Dot-Plot Graphik dargestellt. Durch Streulichtanalysen konnten lebende von toten Zellen, Lymphozyten von Granulozyten und Erythrozyten, ruhende von aktivierten Lymphozyten unterschieden werden.

### **2.2.11.2 Markierung von Oberflächenantigenen**

$10^5$ - $10^6$  Zellen wurden aus der Kultur in 5 ml- Zytometer-Meßröhrchen überführt, mit FACS-Puffer oder PBS gewaschen und in 100 µl FACS-Puffer oder PBS aufgenommen. Wenn vom Hersteller der Antikörper nichts anderes angegeben, wurde die Färbung mit 1 µg AK/Ansatz durchgeführt. Bei Mehrfachfärbungen mit direkt-konjugierten AK wurden alle AK gleichzeitig zugegeben. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit der gleichen Menge entsprechender Isotypenkontrollen gefärbt. Die Inkubation erfolgte entweder für 15 Min. bei RT oder für 30 Min. bei 4°C. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 300 µl FACS-Puffer oder PBS aufgenommen und mit dem Durchflußzytometer analysiert. Bei der Verwendung unkonjugierter Antikörper, die mit einem markierten Sekundärantikörper gegen den Primärantikörper detektiert werden, wurde nach der Primärfärbung 2x gewaschen. Sekundärantikörper wurden in der Regel in einer Konzentration von 0,1 µg/Ansatz verwendet und wie bei der Primärfärbung inkubiert. Bei Mehrfachfärbungen wurden direkt-konjugierte AK gegen andere Oberflächenantigene zusammen mit dem Sekundärantikörper zugegeben. Nach der Oberflächen-Markierung mit biotinylierten Antikörpern erfolgte die Detektion mit 4 µl Streptavidin-PE (Dako) (30 Min. 4°C).

### **2.2.11.3 Oberflächen-Markierung mit anti-CD95L**

Da CD95L auf Lymphozyten in relativ geringer Menge exprimiert und außerdem das Molekül durch Metalloproteinasen von der Oberfläche abgespalten wird, ist die quantitative Bestimmung schwierig. 5 verschiedene Antikörper gegen CD95L wurden auf Spezifität und Färbequalitäten getestet (Ergebnisse s.

Anhang): Klon Nok1 (BD-Pharmingen), Klon BR17 (Diacclone), Klon 4H9 (Immunotech), Klon H11 (Alexis) und Klon 5G5 (freundlich zur Verfügung gestellt von K. Schultze-Osthoff). Von diesen Antikörpern wurde Klon H11 wegen seiner Unspezifität (s. Anhang) nicht mehr weiterverwendet. Die besten Färbereigenschaften zeigten die biotinylierten Klone Nok1 und BR17. Sie wurden für alle nachfolgenden Färbungen von CD95L parallel angewandt. Der Nachweis erfolgte mit 4µl Streptavidin-PE/Ansatz.

Um ein Abspalten des Moleküls zu verzögern, wurde beim Markieren von CD95L streng darauf geachtet, dass alle Schritte bei 4°C durchgeführt wurden. Für den CD95L Nachweis auf aktivierten Lymphozyten wurde zu den Markierungsschritten Metalloproteinaseinhibitor (1µl/ml) hinzugefügt. Die Antikörperbindung erfolgte für 30 Minuten, dann wurden die Proben zweimal gewaschen und anschließend mit Streptavidin-PE für weitere 30 Minuten markiert. Für Mehrfach-Markierungen weiterer Oberflächen-Antigene wurden die jeweiligen Antikörper zusammen mit Streptavidin inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten erfolgte direkt die Messung am Durchflußzytometer. Da das Signal für CD95L immer in Form einer Verschiebung (Shift) vorlag und Populationen nicht eindeutig voneinander abgrenzbar waren, wurde der Anteil der CD95L positiven Zellen und zusätzlich der mittlere Shift der Fluoreszenzintensität (MSFI) folgendermaßen berechnet:

$$\text{MSFI} = \frac{\text{Mittlere Fluoreszenzintensität CD95L AK (Nok1, BR17)}}{\text{Mittlere Fluoreszenzintensität Isotypkontrolle}}$$

Zum Nachweis von CD95L auf retroviral CD95L transduzierten EBV-B-Zellen wurde ein enzymatisches Verstärkungssystem (EAS) der Firma Flow-Amp Systems Ltd nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

### **2.2.11.4 Markierung intrazellulärer Antigene (CD95L)**

Für die Markierung intrazellulärer Proteine müssen die Zellen fixiert und permeabilisiert werden. Durch die Fixierung bleiben die Oberflächenantigene der Zellmembran erhalten, so dass die Zellen anhand dieser identifiziert werden können. Die Permeabilisierung sorgt dafür, dass intrazelluläre Antigene für Antikörper zugänglich werden. Oberflächenantigene wurden vor der Fixierung der Zellen markiert wie oben beschrieben (2.2.9.2.). Die Fixierung von  $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  Zellen im Zytometermeßröhrchen erfolgte mit 500 µl PFA (2% in PBS) für 20 Min. bei Raumtemperatur. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 100 µl Saponin (0,1% in PBS) für 30 Min. bei 4°C permeabilisiert. Im



Rahmen der Doktorarbeit durchgeführte intrazelluläre Färbungen wurden mit biotinylierten Primärantikörpern gegen CD95L (Klon BR17, da nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen mit Nok1 kein CD95L Nachweis möglich) und Streptavidin-PE durchgeführt. Gleichzeitig mit der Permeabilisierung wurde der primäre Antikörper in einer Konzentration von 0,2µg/Ansatz zugegeben. Nach zweimaligen Waschen mit 0,1% Saponin erfolgte die Inkubation mit Streptavidin-PE (4µl einer 1:10 verdünnten Lösung) in 100 µl 0,1% Saponin für 30Min. bei 4°C.

### **2.2.11.5 Apoptosedetektion mittels Annexin V-Markierung**

Apoptose ist gekennzeichnet durch charakteristische Veränderungen der Zellen. Ein frühes Merkmal ist die Externalisierung des Membranlipids Phosphatidylserin (PS), das normalerweise auf der Innenseite der Plasmamembran exprimiert wird. Annexin V (AV) bindet in Gegenwart von Calcium spezifisch und mit hoher Affinität an PS, so dass apoptotische Zellen mit fluoreszenzmarkierten AV-Derivaten markiert werden können. Die Zellen wurden wie für die Oberflächenfärbung (2.2.9.2.) beschrieben geerntet und in Annexin V Binding Puffer (ABP) gewaschen. Die Markierung erfolgte für 5 Min. mit 5 µl Annexin V (PE oder FITC konjugiert) in 100 µl ABP. Nach Zugabe von 200 µl ABP erfolgte ohne weiteren Waschschrift die Analyse mit dem Durchflußzytometer. Mehrfachfärbungen mit Antikörpern wurden gleichzeitig mit AV für 15 Min. bei RT durchgeführt.

In einer späten apoptotischen Phase und bei nekrotischen Zellen ist PS durch Verlust der Membranintegrität für Annexin V zugänglich. Daher wurde bei Analyse von früh apoptotischen Zellen anhand der Streulichtanalyse auf lebende Zellen gegatet. Wenn auch spät apoptotische und nekrotische Zellen detektiert werden sollten (z.B. Cytotoxassay), wurden alle Zellen analysiert.

### **2.2.12 Fluoreszenzmikroskopie**

Wie die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse in der Durchflußzytometrie beruht die Fluoreszenzmikroskopie auf der Tatsache, dass an Antikörper gebundene Fluorochrome durch Beleuchtung mit Licht einer bestimmten spektralen Verteilung zum Eigenleuchten angeregt werden und einen Teil des von ihnen absorbierten Lichts in Form einer langwelligeren Strahlung mit einer genau definierten Wellenlänge abgeben. Durch Anregungsfilter wird eine spezifische Wellenlänge entsprechend dem Anregungsspektrum des Fluorochroms

gewählt. So ist es möglich, durch unterschiedliche Filterkombinationen verschiedene Moleküle eines Präparates, die durch fluoreszierende Antikörper/bindende Proteine markiert sind, zu untersuchen.

Die Zellen wurden wie für die Durchflußzytometrie markiert und danach auf einen Objektträger aufgetropft und ausgestrichen. Auf einer Heizplatte wurden die Objektträger getrocknet und für 90 Sek. in Methanol/Ethanol (1:1) fixiert. Anschließend wurden die Präparate mit *Antifade*-Lösung eingebettet, um das Ausbleichen (engl. fading) zu verhindern und entweder bei 4°C aufbewahrt oder direkt analysiert.

### **2.2.12.1 *In situ* Analyse CD95L transduzierter Fibroblasten**

Zur *in situ* Analyse wurden Fibroblasten in einer Konzentration von  $0,2-0,5 \times 10^5$  in 500 µl kompletten Medium pro Vertiefung eines 8-well Kulturobjektträgers 2 Tage vor der Färbung ausgesät, so dass die Vertiefungen vor der Färbung 1/2 - 1/3 konfluent bewachsen waren. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen auf dem Objektträger mit 500 µl 10% PFA für 15 Min. bei RT fixiert, und anschließend 3x kurz gewaschen. Die Permeabilisierung erfolgte mit 300 µl 1% Saponin. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurde 1 µg Maus IgG1 zugegeben und für 20 Min. bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden dann 2x mit 0,1% Saponin für jeweils 5 Min. gewaschen. Biotinylierter Anti-CD95L (Klon BR17) wurde in einer Konzentration von 0,6 µg/300 µl 0,1% Saponin für 30 Min. auf dem Taumler inkubiert und anschließend 4x 10 Min. mit PBS gewaschen. 8 µl Streptavidin-PE in 200 µl 0,1% Saponin wurden für 30 Min. zugegeben und die Präparate wiederum 4x gewaschen. Nach Entfernung der Kulturrahmen vom Objektträger, wurden die Präparate in *Antifade*-Lösung eingebettet und analysiert.

### **2.2.13 Nachweis von löslichem CD95L (sCD95L) mittels ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)**

Der ELISA Assay ist eine hochsensitive Methode um lösliche Antigene oder Antikörper im Nanogrammbereich nachzuweisen. Dabei reagiert ein Enzym, das an einen Antikörper konjugiert ist, mit einem farblosen Substrat, um ein gefärbtes Reaktionsprodukt zu generieren. Der nach Angaben des Herstellers verwendete CD95L ELISA (Fas Ligand ELISA, Oncogene, San Diego, USA) ist ein sogenannter Sandwich-Enzym Immunoassay. Ein für CD95L spezifischer Antikörper befindet sich immobilisiert auf der Oberfläche der Vertiefungen einer

Mikrotiterplatte. Gefilterter Zellkulturüberstand mit löslichem CD95L (sCD95L) wurde 1:5 mit frischem Medium verdünnt und 3 Stunden in der Mikrotiterplatte inkubiert, um die Bindung von sCD95L an den Antikörper zu ermöglichen. Ein biotinylierter Detektor-Antikörper gegen CD95L wurde zur Bindung an nun immobilisierten sCD95L zugegeben (liegt wie bei einem Sandwich zwischen beiden Antikörpern). Der Nachweis erfolgte nach Zugabe von Meerrettich Peroxidase-konjugiertem Streptavidin, das an den biotinylierten Detektor-Antikörper bindet, mit dem chromogenen Substrat Tetramethylbenzidin (TMB). Die Blaufärbung der positiven Proben wurde mit dem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 450/550 nm gemessen. Nach Erstellung einer Standardkurve mit bekannten Konzentrationen von CD95L ließ sich die sCD95L Konzentration quantifizieren.

### **2.2.14 Funktionelle Analysen von Zellen**

#### **2.2.14.1 Proliferationsassays**

Proliferationsassays wurden zur funktionellen Analyse von T-Zellen nach allogener Stimulation angewendet. Das Prinzip des Assays beruht auf der Tatsache, dass vor jeder Zellteilung eine Zelle neue DNA synthetisiert. Dazu kann sie die benötigten Nukleinsäuren neu synthetisieren, oder sie nimmt sie bei entsprechendem Angebot durch Transporter aus der Umgebung auf. Bei Zugabe von radioaktiven Nukleinsäuren werden diese in die DNA eingebaut und sich teilende Zellen somit radioaktiv markiert. Die Nukleinsäuren Alanin, Guanin und Cytosin werden neben der Synthese von DNA auch zum Aufbau von RNA, die Nukleinsäure Thymidin ausschließlich für den Aufbau der DNA verwendet. Thymidin mit an die Methylgruppe gekoppeltem, radioaktivem Tritium ( $^3\text{H}$ ) eignet sich deshalb zur Proliferationsmessung. Es wird von proliferierenden Zellen aufgenommen und in die DNA eingebaut. Die Radioaktivität des  $\beta$ -Strahlers Tritium wird im Szintillationszähler bestimmt.

MNC oder aufgereinigte T-Zellen wurden wie für die allogene Stimulation beschrieben (s. 2.2.6.4) stimuliert, wobei je 200  $\mu\text{l}$  Zellsuspension mit  $1 \times 10^5$  Responder-Zellen und bestrahlten Stimulatorzellen pro Vertiefung einer 96-well Flachbodenplatte ausgesät wurden. Für die Negativkontrolle (Medium) wurden  $1 \times 10^5$  Zellen mit 200  $\mu\text{l}$  kompletten RPMI alleine, für die Maximalproliferation mit je 0,1  $\mu\text{g}$  OKT3/CD28 in 200  $\mu\text{l}$  RPMI kultiviert. Für 3<sup>rd</sup>-party Stimulationen wurden bestrahlte Feeder-Zellen 1:1 zu Responder-Zellen ausgesät. Die

Stimulationsdauer betrug, wenn nicht anders angegeben 5 Tage. An d5 wurden pro Vertiefung 1  $\mu$ Ci  $^3$ H-Thymidin zugegeben und für weitere 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden beim Ernten auf einem Filter aufgefangen und dieser nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit im  $\beta$ -Zähler gemessen. Der gemessene Wert wurde in counts per minute (CPM, Signale pro Minute) angegeben.

### 2.2.14.2 Zytotoxassays

Während Proliferationsassays vorwiegend CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfassen, da diese deutlich schneller proliferieren als CD8<sup>+</sup> T-Zellen, wird durch Zytotoxassays die Funktionalität zytotoxischer Effektor CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt. Außerdem dienten Zytotoxassays hier der Funktionalitätsprüfung von CD95L transduzierten Zellen, indem deren Zytotoxizität gegenüber CD95L-sensitiven Target-Zellen untersucht wurde.

Die Zytotoxizität wurde anhand Annexin V positiver Target-Zellen bestimmt. Diese wurden zur Unterscheidung von den Effektorzellen mit Calcein-Acetoxymethyl (Ca-AM) markiert. Ca-AM ist ein nicht geladenes Molekül, das Zellmembranen passieren kann und im Zellinneren von Esterasen hydrolysiert wird, - lipophile Gruppen werden abgespalten. Ca-AM ist erst im hydrolysierten Zustand fluoreszierend, so dass nur lebende Zellen markiert werden. In diesem geladenen Zustand kann das Molekül nicht mehr bzw. sehr viel langsamer Zellmembranen überwinden, kann also bei Freigabe ins Medium nicht von den Effektorzellen aufgenommen werden.

Zur Markierung wurden je  $1 \times 10^6$  Zellen in 100  $\mu$ l RPMI mit 200 ng/ ml (Testdauer  $\leq$  4h) bzw. 500 ng/ ml (Testdauer  $\geq$  12h) CaAM für 1 Std bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Targetzellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$ / ml in RPMI aufgenommen. Konnten die Target-Zellen von den Effektorzellen anhand ihrer spezifischen Oberflächenmarker unterschieden werden (z.B. C1R-CD95L (CD19, GFP) / Jurkat-Zellen (CD3)), war keine Ca-AM Markierung notwendig.

Die Effektorzellen wurden je nach gewünschter Effektor-Target (E:T)-Zell Ratio in einer 96-well Rundbodenplatte nach mit Medium verdünnt. Je  $2 \times 10^4$  Targetzellen wurden mit den Effektorzellen über den angegebenen Zeitraum kokultiviert. Für die Spontanlyse wurden Target-Zellen mit Medium allein kultiviert. Die Zellen wurden geerntet, wie unter 2.2.5.7 beschrieben mit Annexin V (AV) markiert und durchflußzytometrisch analysiert.

Die spezifische Zytotoxizität errechnete sich aus:

$$\% \text{ spezifische Zytotoxizität} = \frac{\text{AV Assay} - \text{AV spontan}}{100 - \text{AV spontan}} \times 100$$

#### 2.2.14.3 CD95 vermittelte Apoptosesensitivität

Um die Sensitivität von Zellen gegen CD95 vermittelte Apoptose zu untersuchen, wurden je  $1 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung einer 96-well Flachbodenplatte, mit  $1 \mu\text{g/ml}$  anti-CD95 (Klon Apo 1) für 24h inkubiert, wenn nicht anders angegeben. Für die Spontankontrolle wurden die Zellen mit  $1 \mu\text{g/ml}$  Maus-IgG2a inkubiert. Die Analyse der Zellen erfolgte mit Annexin V (AV) wie unter 2.2.5.7 beschrieben. Die spezifische Apoptose wurde folgendermaßen berechnet:

$$\% \text{ spezifische Apoptose} = \frac{\text{AV induziert} - \text{AV spontan}}{100 - \text{AV spontan}} \times 100$$

#### 2.2.14.4 Suppressorassays

Suppressorassays wurden durchgeführt, um die Funktionalität regulatorischer T-Zellen ( $T_{\text{reg}}$ ) zu untersuchen. Die mit C1R-A1-CD95L bzw. mit C1R-A1<sup>GFP</sup> (Kontrolle) kultivierten T-Zellen wurden hierzu in den angegebenen Konzentrationen (bezogen auf Responder-Zellen) zu einer MLC (s. Abschnitt 2.2.7.4.) aus kryokonservierten MNC des gleichen Spenders (Responder-Zellen) plus 3<sup>rd</sup>-party- (1:1) bzw. EBV-B-Zellen (1:0,5) Stimulator-Zellen gegeben und für 5 Tage kultiviert. Als Kontrollen wurden kryokonservierte MNC mit Stimulator-Zellen alleine („nicht inhibierte MLC“) und kultivierte T-Zellen mit Stimulator-Zellen alleine („Kontrolle“) inkubiert. Die Proliferation der Zellen wurde mittels  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbau bestimmt. Der prozentuale Anteil der MLC-Proliferation (Proliferation %) nach Zugabe von kultivierten T-Zellen wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Proliferation \%} = \frac{(\text{cpm Suppressorsassay}) - (\text{cpm „Kontrolle“})}{(\text{cpm „nicht inhibierte“ MLC})} \times 100$$

Wurde eine suppressorische Kapazität nachgewiesen, war der prozentuale Anteil der MLC-Proliferation kleiner als 100%. Wenn hingegen keine suppressorische Wirkung vorhanden war, betrug die Proliferation  $\geq 100\%$ .

#### 2.2.15 Züchtung apoptoseresistenter B-Zelllinien

Alle verwendeten B-Zellen exprimierten CD95 und waren sensitiv gegen CD95 vermittelte Apoptose. Um auto- und parakrine Apoptose nach Transfektion mit

CD95L zu verhindern, wurden B-Zelllinien vor der Transfektion apoptoseresistent gezüchtet. Hierzu wurden dem Zellkulturmedium 1 µg/ ml anti-CD95 AK (Klon Apo1) zugegeben. 2x pro Woche wurde verbrauchtes Medium durch neues, anti-CD95 enthaltenes Medium ersetzt und die Zellen dabei expandiert. Nach 2 Wochen wurde die anti-CD95-Dosis auf 2 µg/ ml, nach 5 Wochen auf 5 µg/ ml erhöht. Durch Apoptoseinduktion mit 5 µg/ ml Apo1 bzw. 1000ng/ ml sFasL wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Apoptoseresistenz untersucht (s. 2.2.12.3.). Um zu vermeiden, dass im Medium vorhandenes Apo1 CD95-Bindungsstellen blockiert, wurden die Zellen vor dem Apoptoseassay (5-8 Tage) ohne Apo1 inkubiert, bis mittels FITC konjugiertem goat-anti-mouse Sekundär-AK kein gebundener CD95-Antikörper mehr nachzuweisen war.

### **2.2.15.1 Magnetische Selektion und Klonierung CD95 neg. C1R-A1-Zellen**

Um Apoptoseresistenz gegen CD95 vermittelte Apoptose sicherzustellen, sollten CD95 negative Varianten aus C1R und C1R-A1 Zellen selektioniert werden. Hierzu wurden die Zellen zunächst über 6 Wochen mit Apo-1 AK wie oben beschrieben kultiviert um die CD95 Expression zu reduzieren. Je  $30 \times 10^6$  Zellen wurden mit 6 µg anti-Apo-1 in einem Volumen von 600 µl PBS für 20 Min. bei RT inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS und Blockierung unspezifischer Bindungen mit 1:10 humanem IgG (Oktagam) erfolgte die Bindung des PE-konjugierten Sekundär-AK (goat-anti-mouse) für weitere 20 Min. bei RT. Die weitere Selektion erfolgte mit anti-PE-MACS Beads wie unter 2.2.8.2. beschrieben. Da die meisten Zellen vor der Selektion CD95 exprimierten, wenn auch mit geringerer Intensität als vor der Kultivierung mit anti-Apo-1, war die Ausbeute nach der Selektion gering: nur ca. 1000 Zellen waren in beiden Ansätzen übrig. Zur Klonierung wurden diese in 96 well Flachbodenplatten ausgesät und verdünnt, so dass ca. 300, 150, 75, 37 und 18 Zellen pro Vertiefung vorhanden waren. Klonierte C1R-Zellen zeigten keine Proliferation. Nach 4 Wochen konnten aus 2 Vertiefungen C1R-A1-Zellen isoliert werden, in denen durchflußzytometrisch eine deutlich CD95 negative Population abgrenzbar war. Durch erneutes Klonieren und Kultivierung mit anti-Apo-1 wurde eine CD95 negative Variante der C1R-A1-Zellen gewonnen.

## **2.3 Molekularbiologische Methoden**

### **2.3.1 Transformation kompetenter E.coli (DH5 $\alpha$ ) Bakterien**

Die Aufnahme fremder DNA in Form von Plasmid-Konstrukten durch kompetente DH5 $\alpha$  E.coli Bakterien kann durch einen kurzen Hitzeschock erreicht werden. Hierzu wurden 50  $\mu$ l kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 75 ng Plasmid-DNA vorsichtig gemischt. Die Zellen wurden dann einem Hitzeschock bei 37°C für 2 Min. ausgesetzt. Danach wurden 500  $\mu$ l SOC Medium zugegeben und je 100  $\mu$ l auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen (s. 2.1.10.3). Damit kein Kondenswasser auf die Kulturen tropft, wurden die Platten mit dem Deckel nach unten für 18 Std. bei 37°C inkubiert.

### **2.3.2 Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurden Präparationen mit Hilfe von Anionen-Austausch-Säulen der Firma Qiagen durchgeführt.

Die Präparation kleiner Plasmidmengen (bis zu 20  $\mu$ g, Minipräparationen) erfolgte mit dem Plasmid-DNA-Mini-Kit und diente der Überprüfung von Transformationen. Für Minipräparationen wurden nach einer Transformation Einzelkolonien gepickt, in 5 ml LB-Amp Medium überführt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 1,5 ml der Übernachtskultur wurden für die Präparation verwendet. Nach der Präparation wurde die gewonnene DNA in 50  $\mu$ l TE-Puffer aufgenommen.

Für Präparationen größerer DNA-Mengen (bis zu 500  $\mu$ g, Maxipräparationen) wurde der Qiagen Filter Maxi Kit entsprechend der Angaben des Herstellers verwendet. Hierfür wurden 200 ml LB-Amp Medium mit 0,5 ml einer Übernachtskultur (s.o.) beimpft und erneut über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die gewonnene DNA wurde in 200  $\mu$ l TE-Puffer aufgenommen.

### **2.3.3 Aufbewahrung von Bakterienkulturen**

Zur Lagerung von Bakterienklonen nach erfolgreicher Transformation wurden Glycerin-Stocks angelegt. Hierzu wurden 700  $\mu$ l einer Übernachtskultur mit 300  $\mu$ l Glycerol vermischt und bei -80°C aufbewahrt.

### **2.3.4 Konzentrationsbestimmung von DNA**

Die Bestimmung der Konzentration von DNA erfolgte spektrometrisch mit dem Photometer durch Messung der Extinktion einer mit dH<sub>2</sub>O verdünnten Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine optische Dichte von 1 entsprach 50 $\mu$ g/ml dsDNA (double-strand DNA). Das Verhältnis der Extinktionen der Wellenlängen

für DNA (260nm) und RNA (280nm)  $E_{260}/E_{280}$  wurde als Maß für die Reinheit der DNA-Präparation verwendet und lag zwischen 1,8 und 2,0. Die Konzentrationsbestimmung kleiner Mengen DNA ( $< 1\mu\text{g}$  Gesamtmenge) erfolgte nach Auftrennung auf einem Agarosegel durch Vergleich der Bandenintensitäten von Probe und Standard.

### 2.3.5 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Restriktionsenzyme spalten DNA an definierten Stellen und stellen somit ein unerlässliches Werkzeug zur Klonierung und Überprüfung von DNA-Konstrukten dar.

2-3 Units Restriktionsenzym wurden pro  $\mu\text{g}$  DNA mit dem vom Hersteller empfohlenen Puffer eingesetzt. Restriktionen mit zwei Enzymen wurden gleichzeitig vorgenommen, wobei auf gleiche Pufferbedingungen geachtet wurde. Für analytische Zwecke wurde  $1\mu\text{g}$  DNA in  $20\mu\text{l}$  Gesamtvolumen, für einen präparativen Ansatz bis zu  $10\mu\text{g}$  DNA in  $30\mu\text{l}$  Gesamtvolumen eingesetzt. Die Reaktionen wurden für mindestens 1,5 h und bei optimaler Reaktionstemperatur durchgeführt.

### 2.3.6 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA auf Agarose-Gelen erfolgte nach Beschreibung in der gängigen Methodensammlung von Sambrook *et al.* (1989, „Molecular Cloning, A Laboratory Manual“).

### 2.3.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente für Klonierungszwecke zu gewinnen, wurden gewünschte DNA-Banden nach der Auftrennung mittels Gelelektrophorese aus der Agarose ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraktions Kit nach Angaben des Herstellers isoliert.

### 2.3.8 Aufreinigung und Präzipitation von DNA

Die Reinigung von DNA erfolgte mit Phenol/Chloroform (1:1), die Präzipitation mit 1/10 Volumen 3M NaAc pH7,2 und 2,5 Volumen Ethanol *absolut* nach Sambrook *et al.* (1989).

### 2.3.9 Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente *in vitro*. Hierzu werden zwei kurze, einzelsträngige Oligonukleotide als Primer eingesetzt, deren Sequenzen zu den Enden des zu vervielfältigenden DNA-



Fragments komplementär sind. Die PCR besteht aus 3 Schritten, die in Zyklen wiederholt werden:

1. Denaturierung (Schmelzen): Die doppelsträngige DNA wird auf 94-96 °C erhitzt, um durch das Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen die Stränge zu trennen. Im ersten Zyklus wird eine längere Zeit erhitzt, um sicherzustellen, dass sowohl die Ausgangs-DNA als auch die Primer in Einzelsträngen vorliegen.
2. Primerhybridisierung (primer annealing): Durch Senkung der Temperatur lagern sich die Primer an die einzelnen DNA-Stränge an. Die Annealing-Temperatur ist abhängig von den Primern und liegt 2-3 °C unter ihrem Schmelzpunkt.
3. Elongation (Verlängerung, Extension, Polymerisation): Eine hitzebeständige DNA-Polymerase füllt ab dem 3'Ende des Primers den fehlenden Strang mit freien Nukleotiden (dNTPs, 2'Deoxy nukleosid-5'Triphosphat) auf. Ein zum Matritzenstrang komplementärer DNA-Strang wird synthetisiert.

In unseren Experimenten wurde die PCR verwendet, um für die Subklonierung des CD95L (hFL D4) DNA Fragments (s. 2.3.11) Schnittstellen für EcoR1 zu konstruieren. In den verwendeten Primern (s. 2.1.10.5) wurde die Schnittstellensequenz für EcoR1 vor die CD95L spezifische Sequenz eingebaut. Für die Reaktion wurden 1 µl pEF-hFL D4 DNA-Template (1ng), je 0,2µM (2 µl) sense und antisense Primer, je 200µM dNTP, 1 unit Taq-Polymerase auf ein Gesamtvolumen von 50 µl mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Amplifikation fand über 25 Zyklen bei folgenden Temperaturen statt: 30 Sek. 94°C (Denaturierung), 30 Sek. 55°C (Annealing), 60 Sek. 68°C (Elongation). Zu Beginn der Reaktion erfolgte ein verlängerter Denaturierungsschritt für 1 Min. bei 94°C, nach dem letzten Zyklus ein verlängerter Elongationsschritt für 10 Min. bei 68°C.

### **2.3.10 Subklonierung von CD95L-DNA in pIRESpuro2**

Da Transfektionen mit der in den pEF-BOS-Vektor klonierten CD95L DNA (hFL D4, s. Abschnitt 2.1.10.5) nicht erfolgreich waren, wurde in die DNA in pIRESpuro2 (s. 2.1.10.5.) subkloniert. Dieser Vektor eignete sich aufgrund der darin enthaltenen Puromycinresistenz besser für die Selektion von Transfektanten als pEF-BOS, der keinen Selektionsmarker enthielt.

Da keine geeigneten Restriktionsschnittstellen in pEF-hFL D4 vorhanden waren, wurden mit Hilfe einer PCR (s. 2.3.10) EcoR1 Schnittstellen an das

Insert konstruiert. Die PCR Produkte wurden nach Überprüfung mittels eines Kontroll-Agarose Gels mit dem Qiaquick PCR- Aufreinigungskit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Sowohl das aufgereinigte PCR-Produkt als auch die Vektor-DNA wurden mit EcoR1 verdaut und nochmals wie oben aufgereinigt. Um die Religation des linearisierten Plasmids ohne die Aufnahme der hFL D4 DNA zu verhindern, wurden von dem linearen Vektor die 5'Phosphatreste mit Hilfe von SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase aus *P. borealis*) entfernt. Das Enzym wurde in einer Konzentration von 10 Einheiten pro µg DNA zu der nach dem Restriktionsverdau aufgereinigten Vektor-DNA gegeben und mit Einfach SAP-Puffer auf 100 µl aufgefüllt. Nach 15 Min. Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 65°C für 15 Min. gestoppt und die DNA aufgereinigt. Für die Ligation der hFL D4 DNA mit der Vektor-DNA wurde das Enzym T4-DNA-Ligase verwendet, das die Bildung neuer Phosphorsäurediesterbindungen zwischen freien 5'Phosphatgruppen und 3'Hydroxylgruppen katalysiert. In dem Ligationsansatz wurden Vektor und Insert in einem molaren Verhältnis von 1:1 mit 5 Einheiten T4-DNA-Ligase und Ligasepuffer gemischt. Unter Verwendung des „Rapid DNA Ligation Kit“ (Roche) betrug die Ligationsdauer 5 Min. bei RT. Nach der Ligation erfolgte die Amplifikation der DNA in kompetenten *E.coli* Bakterien. Zur Kontrolle des Konstrukt hFL-D4-pIRESpuo2 wurde eine Restriktionskartierung (s. 2.3.5.) mit EcoR1, Apa1 und BamH1 durchgeführt. Die nach dem Verdau ausgewählten Klone mit Insert, das in der korrekten Richtung einkloniert war, wurden vor der Transfektion zur finalen Kontrolle noch sequenziert (GATC Biotech, Konstanz).

### **2.3.11 Transfektion humaner Lymphozyten-Zelllinien**

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in Zellkulturzellen.

Je nach Zellart eignen sich unterschiedliche Methoden zur Transfektion. Dabei ist zu erwähnen, dass es als problematisch gilt, humane Lymphozyten zu transfizieren.

#### **2.3.11.1 Elektroporation**

Bei einer Elektroporation wird die Zellmembran durch Elektroschocks für die Fremd-DNA permeabel gemacht. Durch Anlegung einer elektrischen Spannung kommt es zur Polarisierung der Membran und nachfolgend durch eine lokale

Zerstörung der Membranintegrität spontan zur drastischen Erhöhung ihrer Leitfähigkeit, wodurch stabile hydrophile Poren (0,5-1 nm) mit einer Lebensdauer von wenigen Sekunden bis einigen Minuten entstehen (Sukharev 1994).

C1R, C1R-A1 und EBV-B-Zellen sollten durch Elektroporation mit pEF-hFI D4 (s. 2.1.10.5) und der Vektorkontrolle transfiziert werden. Zur Puromycin-Selektion wurden die Zellen mit pPur kotransfiziert.

Je  $2 \times 10^7$  Zellen wurden in 1ml PBS resuspendiert. 10 µg pEF-hFL D4 bzw Vektor-DNA wurden mit 1 µg pPur in einem Gesamtvolumen von 50 µl (PBS) mit den Zellen gemischt und für 10 Min. auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte in einer kalten, sterilen Elektroporationsküvette im Biorad-Elektroporationsgerät bei einem ein Puls von 200V und 950µF. Danach wurden die Zellen für 10 Min. auf Eis inkubiert. Der Zellertrag nach der Elektroporation betrug 60-85%. Die Zellen wurden in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$ /ml in komplettem RPMI-Medium aufgenommen und bei 37°C kultiviert. Nach 2 Tagen wurde das Medium durch Selektionsmedium mit 500ng/ml (C1R; C1R-A1-Zellen) bzw. 250ng/ml Puromycin (EBV-B-Zellen) ersetzt.

### 2.3.11.2 Lipotransfektion

Alternativ zur Elektroporation sollte die DNA mittels Lipotransfektion in die Zellen eingebracht werden. Liposomen sind Vesikel, die sehr leicht mit der Zellmembran fusionieren, da beide von einer Phospholipiddoppelschicht umgeben sind. In Liposomen verpackte DNA kann deshalb leicht von Zellen aufgenommen werden.

Für die Lipotransfektion wurden 5 µg Vektor- bzw. hFL-D4 DNA und 0,5 µg pPur (oder alternativ das Konstrukt hFL-D4-pIRESpuro2 ) in 300 µl serumfreiem RPMI (SFM) verdünnt. Verschiedene Konzentrationen (10 und 20 µl) Liposomenlösung (LipofectAmin<sup>R</sup>) wurden mit 300 µl SFM verdünnt. Die Liposomen wurden mit der DNA vorsichtig gemischt und für 30 Min. bei RT inkubiert.

C1R- und C1R-A1 Zellen, die in 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen zu 2/3 konfluent gewachsen waren, wurden mit SFM gewaschen. Die Liposomen/DNA Mischung wurde auf 5 ml mit SFM gefüllt und auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte für 7h bei 37°C. Danach wurden 5 ml RPMI mit 20% FCS zugegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. 24 Std. nach der Transfektion wurde das Transfektionsmedium durch komplettes RPMI ausgetauscht. 48 Std. nach der

Transfektion erfolgte die Kultivierung in Selektionsmedium, das 500 ng/ml Puromycin enthielt.

### **2.3.11.3 Lentivirale Transduktion von CD95L in C1R- und C1R-A1 Zellen und Fibroblasten. (T. Wenger, Ingrid Herr DKFZ Heidelberg)**

Im Rahmen eines Kooperationsprojektes wurde die Produktion lentiviraler CD95L-Konstrukte und die Transduktionen von Fibroblasten und apoptoseresistent gezüchteten C1R und C1R-A1 Zellen von Till Wenger (Labor Ingrid Herr) am DKFZ Heidelberg durchgeführt. Der verwendete lentivirale Vektor ist ein Konstrukt aus pWPTS-eGFP (D. Trono, Genf, Schweiz) und pIRES2-EGFP (BD-Biosciences, Heidelberg): die eGFP Sequenz und der EF1 $\alpha$  Promotor vor dem WPRE (Woodchuck hepatitis virus Posttranscriptional Regulatory Element) wurde ersetzt durch die CMV-IRES-eGFP Kasette von pIRES2-EGFP (Wenger *et al.*, 2006). In das daraus entstandene Konstrukt pCIGW wurde humane CD95L cDNA (Wildtyp, nicht mutiert an der Abspaltungs-Stelle) zwischen den CMV Promotor und das IRES-Element einkloniert. Nach der Produktion lentiviraler Partikel (pCIGW bzw. pCIGW-CD95L) durch transfizierte 293-Zellen erfolgte die Transduktion von pCIGW bzw. pCIGW-CD95L in apoptoseresistente C1R- und C1R-A1 Zellen bzw. in Fibroblasten. Durch die in den lentiviralen Konstrukten erhaltene GFP-DNA konnten transduzierte Zellen durchflußzytometrisch detektiert werden. GFP-positive Zellen wurden durchflußzytometrisch mit dem Zellsorter (FACSVantage, BD Biosciences, Heidelberg) aufgereinigt (Wenger, 2005).

### **2.3.12 RT-PCR zum Nachweis von mRNA**

Um die Transkription eines Genes nachzuweisen, wird die abgelesene RNA (messenger-RNA, m-RNA) untersucht. Die DNA-Polymerasen, die bei der Amplifikation von DNA mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, s. Abschnitt 2.3.10.) verwendet werden, sind DNA-abhängig und nicht in der Lage, RNA zu amplifizieren. Daher wird zuerst eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die Reverse Transkriptase (RT) eingesetzt, um RNA in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben. Die cDNA wird im Anschluss als Ausgangsprodukt in einer PCR verwendet, um mit definierten Primern spezifische Sequenzen aus dieser zu amplifizieren. Nur von Zellen, die das Gen transkribiert haben, kann die DNA aus RNA synthetisiert werden.

In unseren Experimenten diente die RT-PCR dem Nachweis von FoxP3. Um eine semiquantitative Aussage treffen zu können, wurde die RNA jeweils aus 5000 Zellen isoliert.

### 2.3.12.1 Isolation von Gesamt-RNA aus Lymphozyten

Für die Gewinnung von Gesamt-RNA aus Lymphozyten wurde der RNeasy Protect Mini Kit von Qiagen verwendet. Vor der Isolation wurden tote Zellen mittels Ficoll- (s. 2.2.8.3.) von viablen Zellen separiert. 5000 lebende Zellen wurden in 5 µl PBS zur Stabilisierung der RNA mit 50 µl RNA*later* RNA Stabilisierungs Reagenz verdünnt und bei 4°C oder –20°C konserviert. Aus zu verschiedenen Zeitpunkten konservierten Zellen eines Versuchsansatzes wurde RNA nach Angaben des Herstellers isoliert. Die RNA wurde in 30 µl RNase freiem DEPC-Wasser eluiert.

### 2.3.12.2 Reverse Transkription von RNA in cDNA und PCR Amplifikation

Für die RT-PCR wurde das SuperScript™ III One-Step RT-PCR System (Invitrogen) verwendet. Reverse Transkription mit einer modifizierten M-MLV Reversen Transkriptase und PCR Amplifikation mittels Taq DNA Polymerase konnte damit in einem Schritt durchgeführt werden. Die Reaktionsbedingungen für die FoxP3 und GAPDH (Kontrolle) RT-PCR sind in Tab. 2.4. aufgeführt.

	<b>FoxP3</b>	<b>GAPDH</b>
RNA-Vorlage	5 µl	1 µl
Primer (10µM)	je 1 µl	je 1 µl
Enzym-Mix	1,5 µl	1 µl
Reaktions-Mix (Puffer und dNTPs)	10 µl	10 µl
Gesamtvolumen (DEPC-H <sub>2</sub> O <b>ad</b> )	20 µl	20 µl
Temperaturprofil	30 Min 61°C (DNA Synth.) 2 Min 94°C (Denat.)  <b>33 Zyklen:</b> 30 Sek 94°C (Denat.) 30 Sek 61°C (Anneal.) 30 Sek 68°C (Extension)  Finale Extension.: 5 Min 68°C	30 Min 58°C 2 Min 94°C  <b>33 Zyklen:</b> 30 Sek 94°C 30 Sek 58°C 30 Sek 68°C  5 Min 68°C

**Tab. 2.4. Reaktionsbedingungen für die RT-PCR**

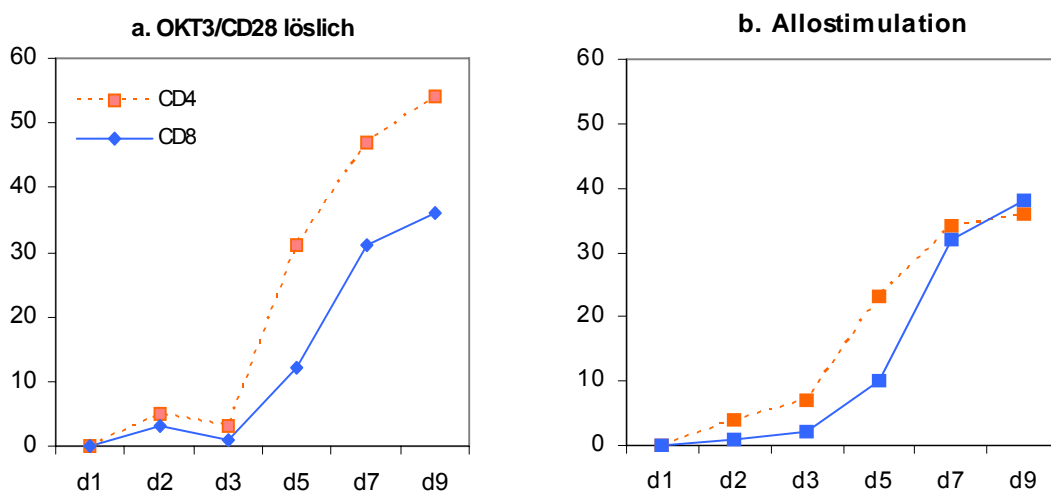
### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Vorarbeiten

##### 3.1.1 Sensitivität stimulierter T-Zellen gegenüber anti-CD95 induzierter Apoptose

Als Vorarbeit für das Projekt der Depletion alloreaktiver T-Zellen durch CD95/CD95L vermittelte Apoptose musste zunächst geklärt werden, ob eine Sensitivität aktivierter T-Zellen für diesen Apoptoseweg überhaupt vorhanden ist. In der Literatur waren diesbezüglich widersprüchliche Ergebnisse veröffentlicht (Klas *et.al.*, 1993; McLeod *et. al.*, 1998).

MNC wurden mit OKT3/CD28 oder mit allogenen Zellen in Kulturen stimuliert. Zu definierten Zeitpunkten wurden die so stimulierten Zellen mit anti-CD95 Antikörper inkubiert und die Rate apoptotischer CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Eine Sensitivität gegenüber CD95 vermittelter Apoptose war ab Tag 3 bzw. ab Tag 5 (je nach Kultursystem) gegeben. CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen zeigten unterschiedliche Sensitivität, sie war bei CD4<sup>+</sup> Zellen höher als bei CD8<sup>+</sup> Zellen, vorallem nach OKT3/CD28 Stimulation (Abb. 3.1.a).



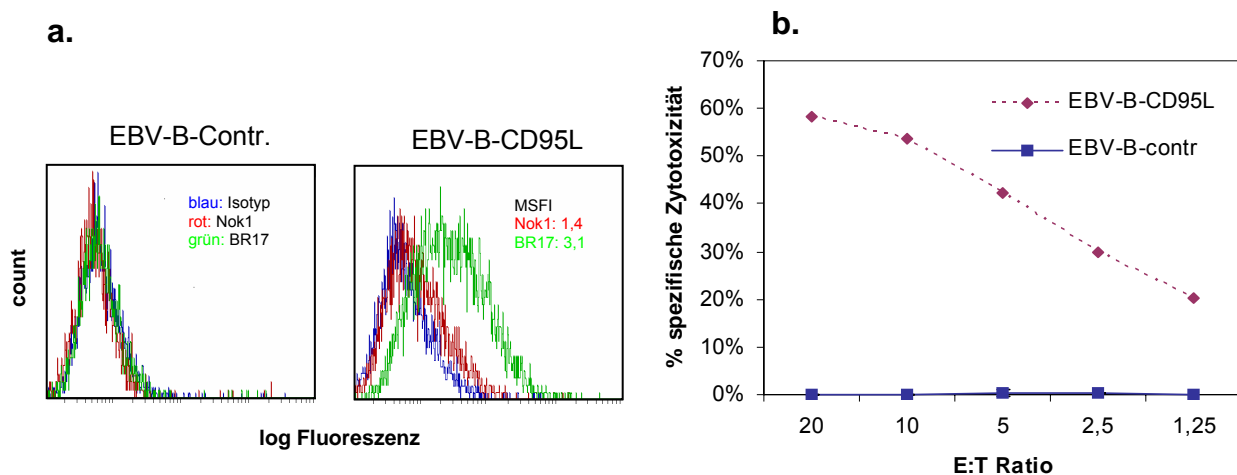
**Abbildung 3.1.**

**Apoptosesensitivität aktivierter T-Zellen in Stimulationskulturen.** MNC wurden über den angegebenen Zeitraum entweder mit löslichem OKT3/CD28 (a.) oder mit EBV-B-Zellen alloantigen-spezifisch stimuliert (b.). An den angegebenen Tagen wurde den Kulturen 2µg/ml anti CD95 (Klon anti Apo-1) für 24h zugesetzt, um Apoptose zu induzieren. Für die Bestimmung der Spontanapoptose wurden die Zellen für 24h mit 2µg/ml Maus-IgG3 inkubiert. Apoptose wurde durch Annexin V/ CD4/ CD8 Dreifachfärbung durchflusszytometrisch analysiert. Die spezifische Apoptose errechnete sich aus:

$$\% \text{ spezifische Apoptose} = \frac{\text{AV induziert} - \text{AV spontan}}{100 - \text{AV spontan}} \times 100$$

### 3.1.2 Apoptoseinduktion mittels retroviral CD95L-transduzierter EBV-B Zellen

Erste Versuche zur CD95L vermittelten Apoptoseinduktion aktivierter T-Zellen wurden mit EBV-transformierten B-Zellen durchgeführt, welche mit Wildtyp CD95L DNA transduziert waren (I. Herr, DKFZ Heidelberg). Als Kontrolle dienten Vektor-transduzierte EBV-B-Zellen (EBV-B-contr). Obwohl die Oberflächenexpression von CD95L auf den transduzierten EBV-B-Zellen (EBV-B-CD95L) gering war und nur mittels eines enzymatischen Verstärkersystems nachgewiesen werden konnte, waren die Zellen biologisch aktiv. Dies konnte in Zytotoxassays mit Jurkatzellen gezeigt werden, in denen EBV-B-CD95L bis zu 60% Apoptose auslösten (Abb. 3.2.).



**Abb. 3.2.a Oberflächenexpression von CD95L nach retroviraler Transduktion von CD95L in EBV-B-Zellen.** Die Oberflächenexpression von CD95L auf den transduzierten Zellen konnte mittels eines enzymatischen Verstärkersystems (enzymatic amplification staining, EAS, Firma Caltag) nachgewiesen werden. Zwei unterschiedliche biotinylierte Antikörperklone wurden benutzt: Klon Nok1 (Pharmingen) (rotes Histogramm) und Klon BR17 (Diaclone) (grünes Histogramm). Biotinyliertes Maus-IgG1-Biotin diente als Isotypkontrolle (blaues Histogramm). **b. Zytotoxische Aktivität von EBV-B-CD95L**

CaAM markierte Jurkat-Zellen wurden mit EBV-CD95L oder Vektor-transduzierten Kontrollzellen in den angegebenen Effektor:Target (E:T)-Ratios für 10h kokultiviert. Die Bestimmung der spezifischen Zytotoxizität erfolgte nach AnnexinV-Färbung der CaAM markierten Zellen und wurde folgendermaßen berechnet:  

$$\frac{((AV \text{ Jurkat Zytotox-Assay} - AV \text{ Jurkat spontan}))}{(100 - AV \text{ spontan})} \times 100.$$

Untersuchungen dieser CD95-L exprimierenden Zellen zur Apoptoseinduktion von allo-aktivierten T-Zellen verliefen enttäuschend. Die Apoptoserate war gering, es zeigten sich nur geringe Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollkulturen mit Vektor-transduzierten EBV-B-Zellen (nicht gezeigt).

Eine Erklärung hierfür könnte die geringe CD95L-Oberflächenexpression der B Zellen darstellen. Als eine weitere Erklärung kam die hohe

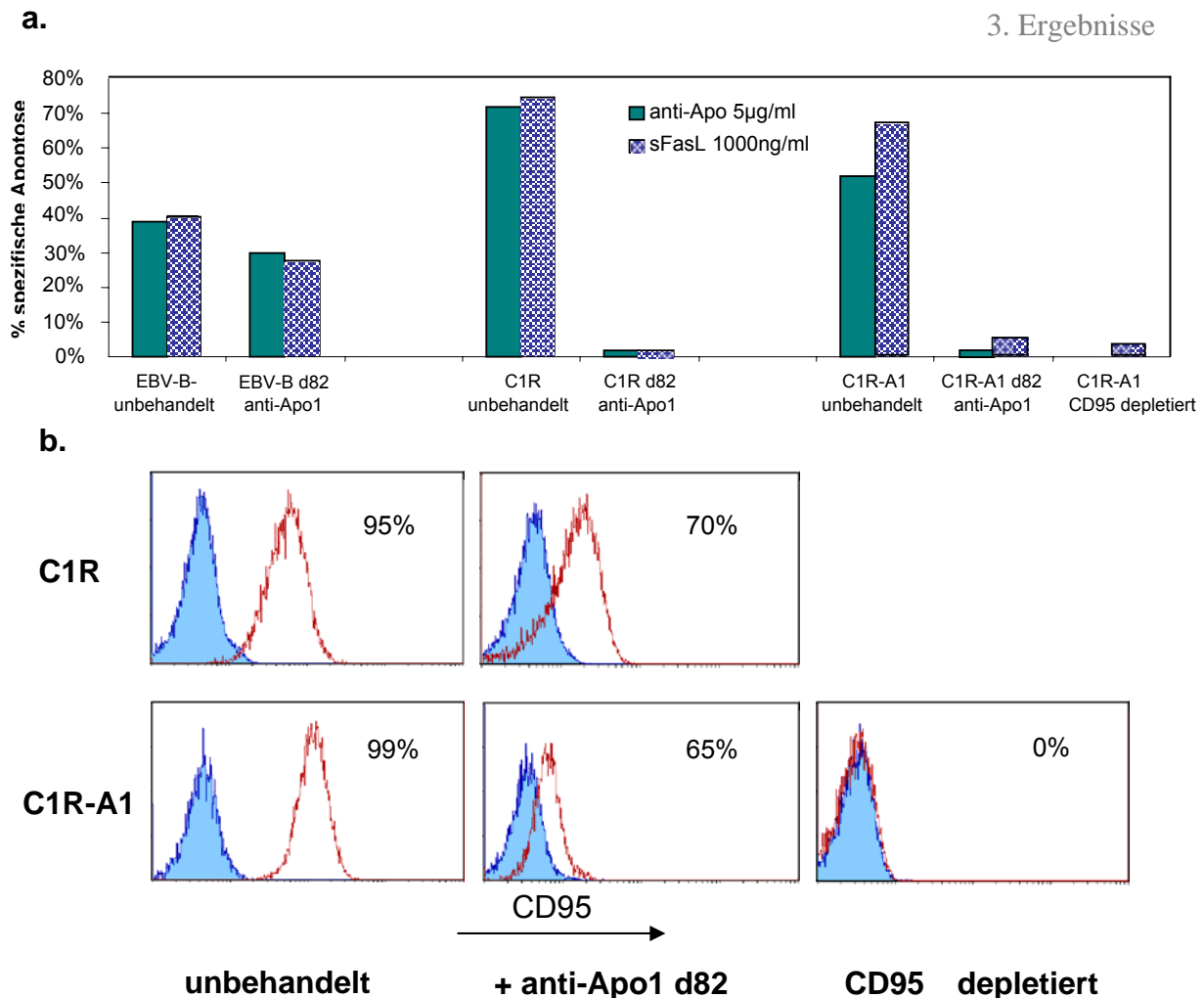
Spontanapoptoserate (40-60%) der EBV-B-CD95L im Vergleich zu den Kontrollzellen (10-20%) in Frage, so dass für die Funktionalität der Zellen nicht mehr ausreichend viable EBV-B-CD95L in den Kulturen vorhanden waren.

Untersuchungen zur Apoptosesensitivität von EBV-B-CD95L zeigten eine persistierende Sensitivität für CD95L vermittelte Apoptose (spezifische Apoptose nach anti-Apo1 Inkubation: 48%). Die Folgerung lag daher nahe, dass CD95L transduzierte EBV-B-Zellen para- und/oder autokrin Apoptose induzierten. Dies äusserte sich auch in einer schlechten Proliferation und einem hohem Anteil apoptotischer Zellen in Expansionskulturen von EBV-B-CD95L. Um dieses Problem zu umgehen, wurde daher versucht, apoptoseresistente Zell-Linien für die Transfektion zu generieren.

### **3.1.3 Generierung von apoptoseresistenten Zell-Linien für die Transfektion mit CD95L**

Nachdem primär keine apoptoseresistenten B-Zell Linien zur Verfügung standen, wurden Zell-Linien gezüchtet, die resistent gegen CD95 vermittelte Apoptose waren. Hierzu wurden sowohl EBV-B-Zellen als auch zwei weitere, semiadhärente B-Zell Linien verwendet: C1R- und C1R-A1 Zellen (s. Material und Methoden, Abschnitt 2.1.9.2.). Durch kontinuierliche Inkubation mit anti-Apo1 (anti CD95 mAK) in steigenden Konzentrationen (1-2 µg/ml – 5 µg/ml) über 12 Wochen wurden C1R- und C1R-A1 Zellen gezüchtet, die zunehmend resistent gegen CD95/CD95L vermittelte Apoptose waren und schließlich keine Sensitivität mehr vorwiesen (Abb. 3.3.a.). Die CD95-**Rezeptor** Expression sank von >95% auf <70% (Abb. 3.3.b.). Zusätzlich gelang es durch magnetische Depletion, CD95 negative C1R-A1 Zellen zu isolieren (Abb. 3.3.b.), die erwartungsgemäß resistent gegen CD95/CD95L vermittelte Apoptose waren (Abb. 3.3.a.). In EBV-B-Zellen wurde keine Apoptoseresistenz erzielt (Abb. 3.3.a.).





**Abb. 3.3. Generierung von Apoptoseresistenz in B-Zell-Linien**

**a. Apoptoseresistenz in C1R- und C1R-A1-Zellen.** EBV-B-Zellen, C1R und C1R-A1 Zellen wurden über 82 Tage unter Zusatz steigender Konzentrationen (2-5 µg/ml) anti-Apo1 kultiviert, um eine Apoptoseresistenz zu erreichen. Vor dem Apoptosetest wurden die Zellen für 8 Tage ohne anti-Apo1 kultiviert, um eine Beeinflussung des Test-Ergebnisses durch bereits gebundenes anti-Apo 1 zu verhindern. Ebenso wurde die Apoptoseresistenz einer CD95 negativen Variante von C1R-A1 Zellen untersucht, die durch magnetische Depletion gewonnen wurde (C1R-A1 CD95 depletiert). Nach 24h Inkubation mit 5µg/ml anti-Apo1 (grüne Balken) bzw 1000ng/ml löslichem CD95L (sFasL) wurden apoptotische Zellen mittels AnnexinV (AV) Färbung detektiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Für die Spontanapoptose wurden die Zellen mit 5µg/ml Maus- IgG3 inkubiert. Die spezifische Apoptose errechnete sich aus:  $((AV \text{ induziert} - AV \text{ spontan}) / (100 - AV \text{ spontan})) \times 100$ .

**b. CD95 Rezeptor Expression in apoptoseresistenten C1R- und C1R-A1 Zellen.** Die Oberflächenexpression von CD95 wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Vor den Färbungen wurden Zellen, die über 82 Tage mit anti-Apo1 inkubiert worden waren für 8 Tage ohne Antikörper kultiviert, um eine Beeinträchtigung des Signals durch bereits gebundenen anti CD95 AK zu verhindern.

### 3.1.4 Zusammenfassung Vorarbeiten

Es wurde gezeigt, dass eine Apoptosesensitivität aktivierter T-Zellen in allen getesteten Stimulationssystemen vorhanden war. Alloantigen-aktivierte T-Zellen waren ab Tag 5 der Stimulation sensitiv für anti-CD95 vermittelte Apoptose.

Retroviral CD95L-transduzierte B-Zellen eigneten sich aufgrund ihrer geringen CD95L Expression und hohen Spontanapoptoserate nicht zur Apoptoseinduktion in aktivierten T-Zellen.

Apoptoseresistenz wurde in den B-Zell-Linien C1R und C1R-A1 erzielt. Diese konnten nachfolgend für die Transduktion mit CD95L verwendet werden, ohne danach para- oder/und autokrine Apoptose auszulösen.

Somit waren wichtige Voraussetzungen für das Projekt zur Depletion alloreaktiver T-Zellen mittels CD95L vermittelter Apoptose erfüllt.

## **3.2 Generierung CD95L exprimierender Zellen mittels**

### **Gentransfer**

Für die Transfektion von CD95L wurden sowohl apoptoseresistente C1R- und C1R-A1-Zellen, als auch primäre Fibroblasten, die eine konstitutive Apoptoseresistenz aufwiesen, verwendet.

#### **3.2.1 CD95L Transfektion von C1R/C1R-A1 Zellen mittels Elektroporation und Lipofektion**

Um ein Abspalten von CD95L auf den transfizierten Zellen zu vermeiden, wurde für die Transfektionen das Konstrukt pEF-hFID4 verwendet (zur Verfügung gestellt von S. Nagata). Die enthaltene CD95L Sequenz dieses Vektors war an der Cleavage-Site mutiert, so dass das resultierende CD95L Molekül nicht von der Zelloberfläche abgespalten werden konnte (Tanaka et. al., 1998). Da das Konstrukt keine Selektions-DNA enthielt, wurden die Zellen mit dem Puromycinresistenz Vektor pPur kotransfiziert. Nach der Transfektion durch Elektroporation konnten keine puromycin-resistenten Klone gewonnen werden. Anders durch Lipofektion: Hier entwickelten sich sowohl in C1R als auch in C1R-A1 Zellen nach dem Gentransfer puromycin-resistente Klone. Dennoch war in diesen Zellen kein CD95L nachweisbar. Dies wurde dahingehend interpretiert, dass nur Zellen proliferierten, die pPur alleine, ohne pEF-HFID4 insertiert hatten. Um diesem Problem auszuweichen, wurde die CD95L DNA aus dem pEF-BOS Vektor ausgeschnitten und in pIRES puro 2 umklont. Dieser Vektor enthielt eine Puromycinresistenz, so dass nach erfolgreicher Transfektion und Puromycinselektion nur Zellen proliferieren konnten, die sowohl CD95L als auch die Puromycinresistenz trugen. Transfektionsversuche mittels Lipofektion führten zu einer transienten Puromycinresistenz von maximal 10 Tagen. Nach dieser Zeit starben die Zellen unter Puromycingabe. Eine stabile Transfektion konnte in keinem Ansatz erreicht werden.

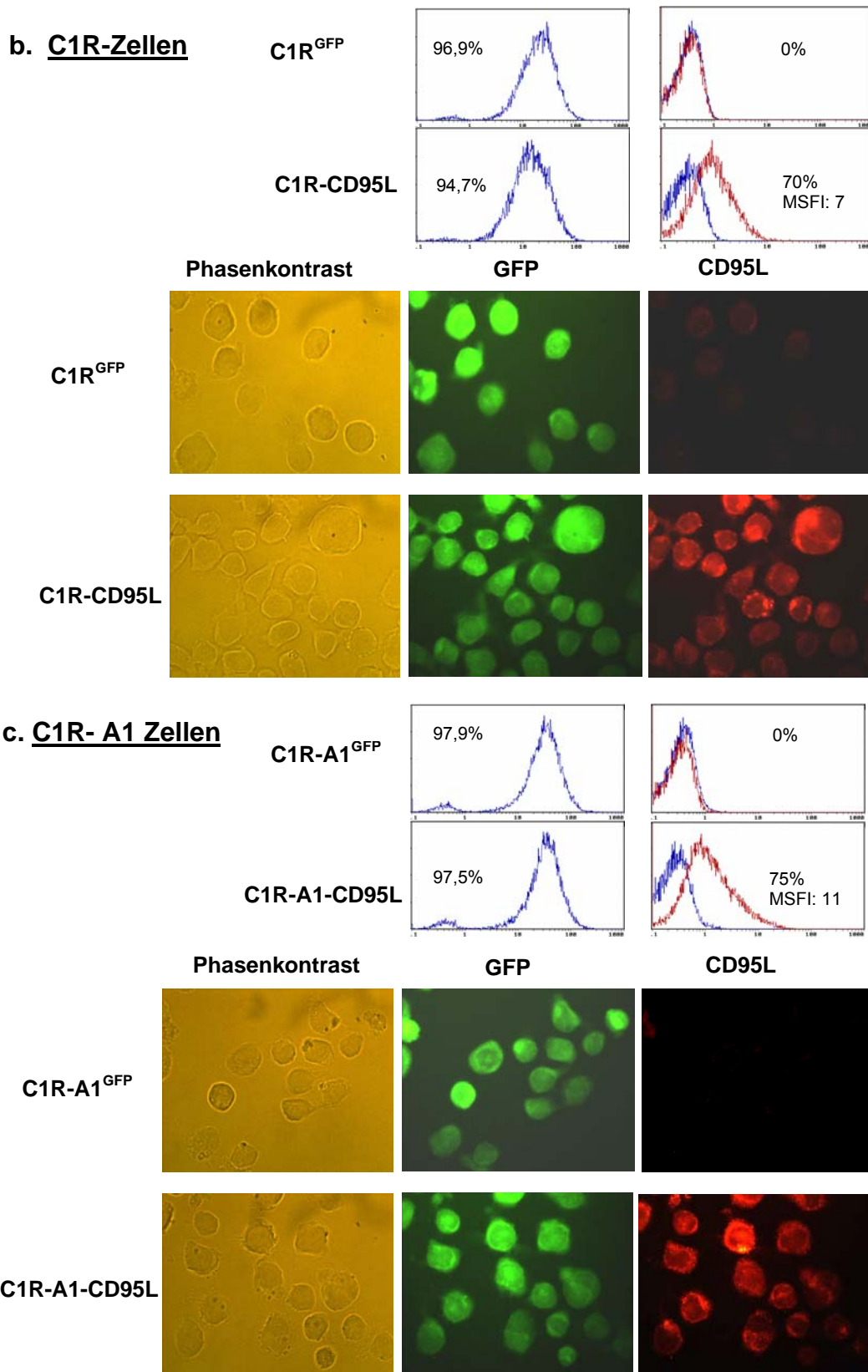
### 3.2.2 CD95L Expression in C1R- und C1R-A1-Zellen nach lentiviraler Transduktion

Eine Alternative für stabile Transfektionen stellten virale Transduktionsmethoden dar. Weil auch langsam proliferierende Fibroblasten transduziert werden sollten, war die lentivirale Transduktion die Methode der Wahl. Da diese in der Arbeitsgruppe von Ingrid Herr am DKFZ in Heidelberg (Arbeitsgruppe Molekulare Uroonkologie und Dermatoonkologie) etabliert war und bereits ein lentivirales CD95L Konstrukt zur Verfügung stand, wurden apoptoseresistente C1R- und C1R-A1 Zellen dort transduziert (T. Wenger). Hierzu wurde im Gegensatz zu den oben genannten Transfektionsversuchen Wildtyp-CD95L DNA ohne Mutation der Cleavage-Site verwendet.

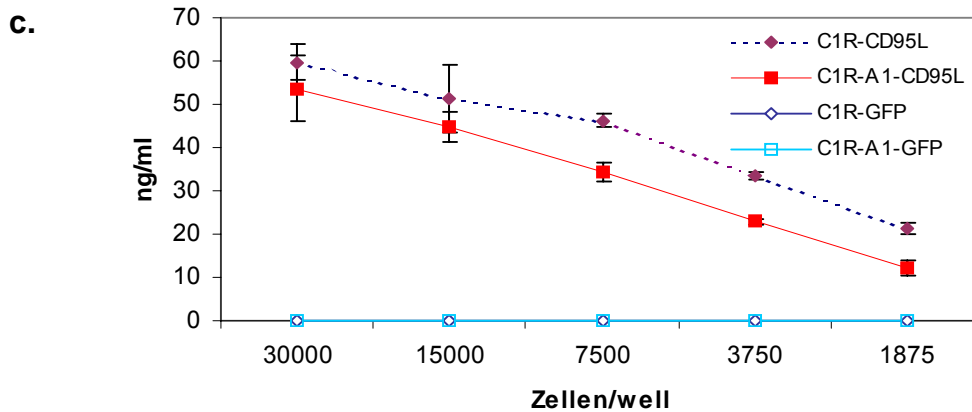
Das lentivirale Konstrukt pCIGW-CD95L, mit dem apoptoseresistente C1R- und C1R-A1-Zellen transduziert wurden, enthielt als Markergen das grün fluoreszierende Protein GFP. Nach Transduktion und Selektion der GFP-positiven Zellen im Zell-Sorter waren  $\geq 95\%$  der Zellen GFP positiv (Abb. 3.4.a,b). Bis zu 70% der Zellen exprimierten membrangebundenen CD95L (mCD95L) auf ihrer Zelloberfläche (Abb. 3.4.a,b). Auffallend war, dass CD95L transduzierte C1R-Zellen (C1R-CD95L) mit um ca.  $\frac{1}{2}$  log geringerer Intensität GFP exprimierten und der Fluoreszenzshift für CD95L mit 7 vs. 11 geringer war, als bei CD95L transduzierten C1R-A1 Zellen (C1R-A1-CD95L) (Abb. 3.4.a,b). Nachgewiesen wurde der Ligand sowohl mit dem anti-CD95L Antikörperklon BR17 als auch mit Klon Nok1 (nicht gezeigt).

Auch fluoreszenzmikroskopisch gelang der Nachweis von CD95L: hier wurde deutlich, dass das Molekül von den transduzierten Zellen vorwiegend extrazellulär geclustert exprimiert wird (Abb. 3.4. a, b). Die hohe Oberflächenexpression des Moleküls war insofern überraschend, als für hämatopoetische Zellen auch nach Transfektion vorwiegend eine intrazelluläre Expression von CD95L beschrieben ist (Bossi und Griffiths, 1999).

Da die Zellen mit der Wildtyp-DNA transduziert wurden, wurde CD95L auch von der Zellmembran abgespalten und war daher in löslicher Form (sCD95L) im Kulturmedium nachweisbar: mittels ELISA konnten bis zu 60ng/ml CD95L im Kulturüberstand von 30 000 Zellen detektiert werden (Abb. 3.4.c.).



**Abb. 3.4.a,b Zelluläre Expression von CD95L in lentiviral transduzierten C1R und C1R-A1 Zellen.** Lentiviral transduzierte C1R (b.) und C1R-A1 (c.) Zellen wurden mit biotinyliertem anti-CD95L (Klon BR17) und Streptavidin-PE gefärbt. Für die durchflußzytometrische Analyse (Histogramme) wurde eine Oberflächenfärbung durchgeführt, für den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert, so dass zusätzlich zur Oberflächenexpression auch intrazelluläres CD95L markiert wurde. Links: Phasenkontrastmikroskopie; Mitte: GFP Expression; Rechts: CD95L Expression (100-fache Vergrößerung).

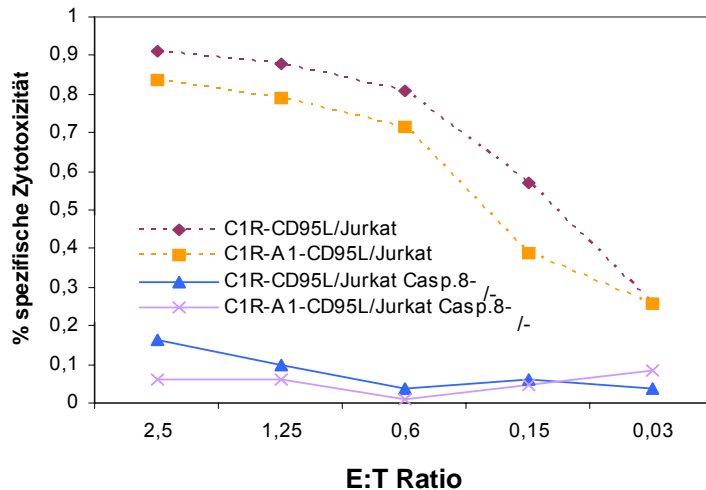


**Abb. 3.4.c. Nachweis von löslichem CD95L (sCD95L) im Kulturüberstand von transduzierten C1R- und C1R-A1 Zellen.** Hierzu wurden die Zellen 5 Tage vor dem Assay in den angegebenen Zellkonzentrationen/well ausgesät. sCD95L wurde in filtriertem Kulturüberstand mittels Elisa nachgewiesen. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichung von Dreifachbestimmungen.

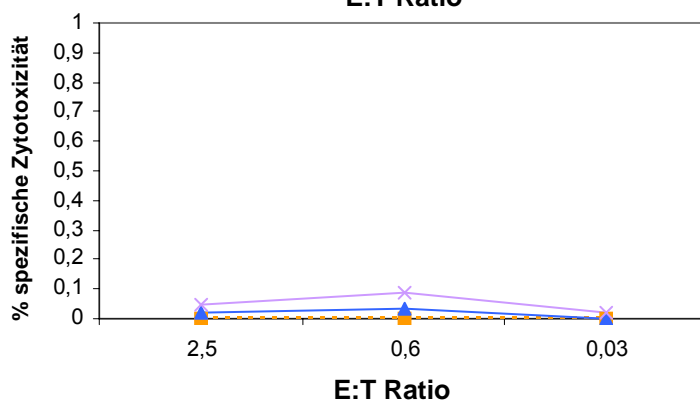
### 3.2.2.1 Zytotoxische Aktivität von C1R-CD95L und C1R-A1-CD95L

Aufgrund der hohen CD95L Oberflächenexpression zeigten die transduzierten Zellen erwartungsgemäß eine hohe zytotoxische Aktivität: Nach Kokultivierung mit apoptosesensitiven Jurkatzellen wurden bereits bei einer Effektor zu Target Ratio von 0,6 70-90% der Target-Zellen lysiert (Abb. 3.5.a.). Um zu zeigen, dass die induzierte Apoptose CD95L abhängig war, wurden Caspase 8<sup>-/-</sup> Jurkat Zellen als Target Zellen verwendet, die nicht sensitiv für den Caspase-abhängigen Weg der CD95 vermittelten Apoptose sind. Hier konnte keine spezifische Zytotoxizität beobachtet werden (Abb. 3.5.a.). Ebenso wurde bei Einsatz der mit dem Kontroll-Vektor transduzierten C1R<sup>GFP</sup> und C1R-A1<sup>GFP</sup> - Effektorzellen keine Apoptose ausgelöst (Abb. 3.5.b.). Dieses Ergebnis belegt die CD95L-Abhängigkeit der Zytotoxizität durch C1R-CD95L und C1R-A1-CD95L.

a.



b.

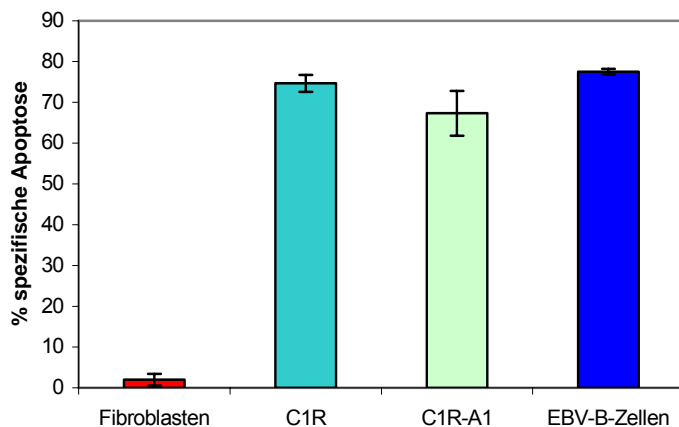
**Abb. 3.5.****Zytotoxische Aktivität mit CD95L lentiviral transduzierter C1R und C1R-A1 Zellen**

C1R-CD95L und C1R-A1-CD95L wurden für 6h mit apoptosesensitiven bzw apoptoresistenten, Caspase 8<sup>-/-</sup> Jurkat-Zellen in den angegebenen Effektor:Target Konzentrationen (E:T Ratio) kokultiviert. Die Analyse apoptotischer Jurkatzellen erfolgte nach AnnexinV/CD3 Färbung im Zytometer (a). Als Kontrolle dienten Vektor-transduzierte C1R<sup>GFP</sup> und C1R-A1-GFP Zellen (b). Die Berechnung der spezifischen Zytotoxizität erfolgte wie in 2.2.12.2. beschrieben.

Zusammengefasst konnte durch lentivirale Transduktion von CD95L in apoptoresistente C1R und C1R-A1 Zellen eine stabile Expression von CD95L mit hoher biologischer Aktivität erreicht werden.

### 3.2.3 Apoptoresistenz von Fibroblasten und CD95L Expression nach lentiviraler Transfektion.

Wie in Abschnitt 3.1.2. beschrieben, ist eine Voraussetzung für die Proliferation von Zellen nach stabiler Transfektion mit CD95L die Resistenz gegen CD95 vermittelte Apoptose. Kultivierte Fibroblasten exprimierten nur zu etwa 15% den CD95 Rezeptor (nicht gezeigt). Diese Zellen wurden vor lentiviraler Transduktion auf ihre Sensitivität gegen CD95 vermittelte Apoptose untersucht. Fibroblasten zeigten nach Inkubation mit Anti-CD95-Antikörper (Klon Anti-Apo1) konstitutive Apoptoresistenz: Auch nach 96h war keine höhere Apoptose zu erkennen (nicht gezeigt) während C1R, C1R-A1- und EBV-B-Zellen bereits nach 24h eine Apoptoserate von 70-80% aufwiesen (Abb. 3.6.).

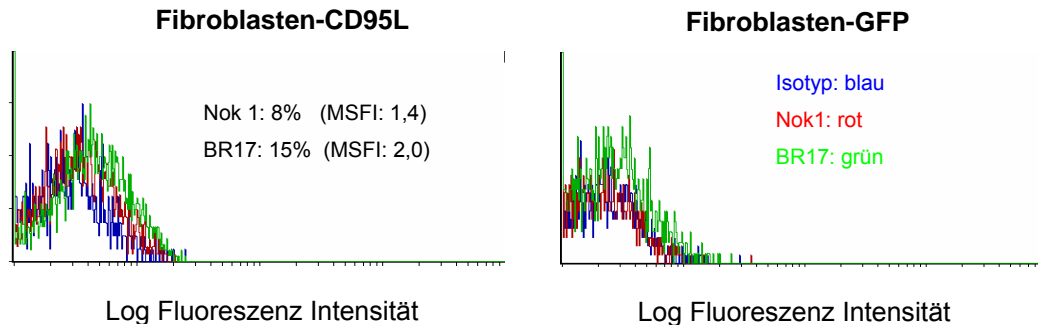


**Abb. 3.6.**  
**Apoptosesensitivität von Fibroblasten im Vergleich zu C1R-, C1R-A1-, und EBV-B-Zellen.** Fibroblasten, C1R-, C1R-A1- und EBV-B-Zellen wurden für 24 Stunden mit 1µg/ml anti-Apo1 inkubiert. Für die Spontanapoptose wurde zum Medium 1µg/ml IgG3 zugegeben. Die Apoptosedetektion erfolgte durchflußzytometrisch mittels AnnexinV (AV)-Markierung. Die spezifische Apoptose errechnete sich aus:  $((AV \text{ induziert} - AV \text{ spontan}) / (100 - AV \text{ spontan})) \times 100$ .

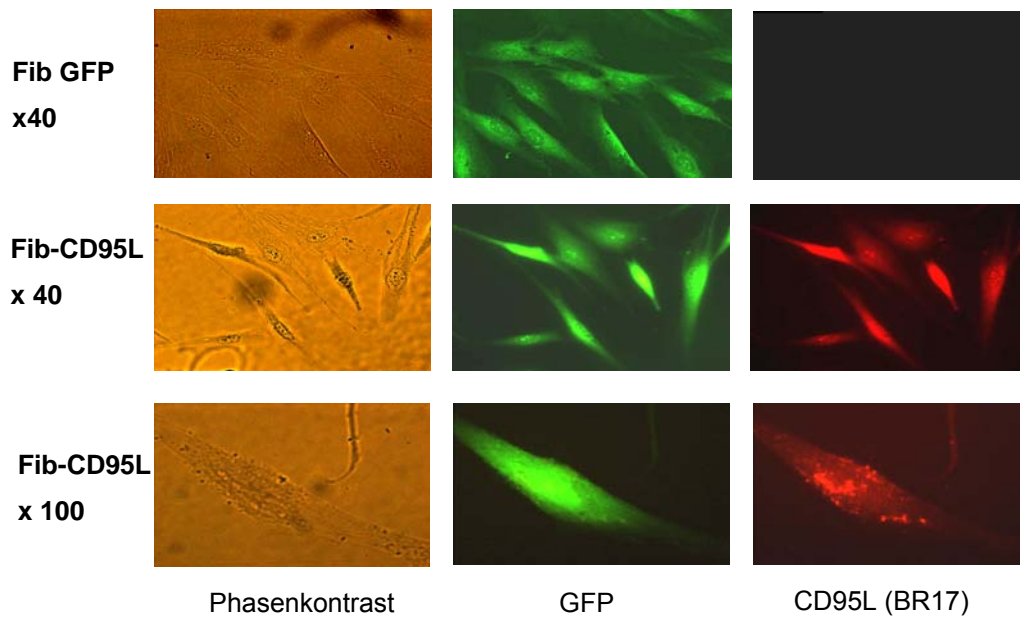
Die Fibroblasten wurden wie für C1R und C1R-A1-Zellen beschrieben mit pCIGW-CD95L (Fib-CD95L) bzw. mit dem leeren Vektor als Kontrolle (Fib-GFP) lentiviral transduziert. Eine anschließende Selektion der GFP-positiven Zellen über den Zell-Sorter führte zu einer Anreicherung GFP-positiver Fibroblasten auf 95%. Die CD95L Oberflächenexpression war jedoch auf den transduzierten Zellen schwach: nur 8-15% der Zellen exprimierten CD95L (Abb. 3.7.b.). Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung wurden die Zellen auf Kultur-Objektträgern (Chamber slides) kultiviert, so dass eine *in situ* Färbung der Zellen nach Fixierung und Permeabilisierung möglich war. Hierbei zeigte sich eine vorwiegend intrazelluläre, geclusterte Expression des Liganden (Abb. 3.7.c.).

Um zu klären, ob CD95L in löslicher Form im Kulturmedium vorhanden ist, wurde der Überstand der Fibroblastenkultur mittels ELISA untersucht. Hier konnten bis zu 30ng/ml nachgewiesen werden (Abb. 3.7.a). Auffallend war, dass während der Kultur der CD95L transduzierten Zellen eine deutliche Abnahme der Zellzahl stattfand im Gegensatz zur Kontrollkultur mit Vektor-transduzierten Zellen. Dies wurde dahingehend gedeutet, dass während der Kultur trotz Apoptoseresistenz gegenüber anti-Apo1 (Abb. 3.6.) autokrin Apoptose induziert wurde. Hierbei spielt wahrscheinlich die CD95L-Oberflächenexpression der transduzierten Zellen und deren höhere Effektivität der Apoptoseinduktion im Vergleich zu anti-Apo1 eine Rolle. Dennoch wurden Versuche durchgeführt, um zu klären, inwiefern Fib-CD95L als Induktoren von Apoptose in aktivierten T-Zellen geeignet sein könnten (Abschnitt 3.3.3).

a.

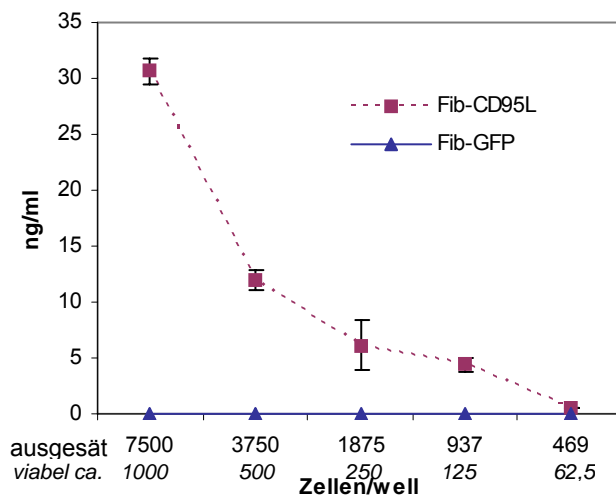


b.



**Abb. 3.7.a/b Expression von CD95L in lentiviral transduzierten CD95L-Fibroblasten**  
**a. Durchflußzytometrischer Nachweis von Oberflächen-CD95L (m-CD95L).** Für den durchflußzytometrischen Nachweis von m-CD95L wurden die Zellen mit biotinyliertem CD95L-AK, Klon Nok1 (rotes Histogramm) bzw. Klon BR17 (grünes Histogramm) und anschließend Streptavidin-PE gefärbt. Als Isotypkontrolle diente biotinyliertes IgG1 (blaues Histogramm). Als Kontrollzellen wurden Fibroblasten verwendet, die mit dem GFP-Vektor pCIGW allein transduziert worden waren (Fib-GFP), links, die mit CD95L transduzierten Fibroblasten (Fib-CD95L) sind rechts gezeigt.

**b. Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis.** Der fluoreszenzmikroskopische Nachweis erfolgte in situ nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen und Färbung mit biotinyliertem anti-CD95L (BR17) und Streptavidin-PE.



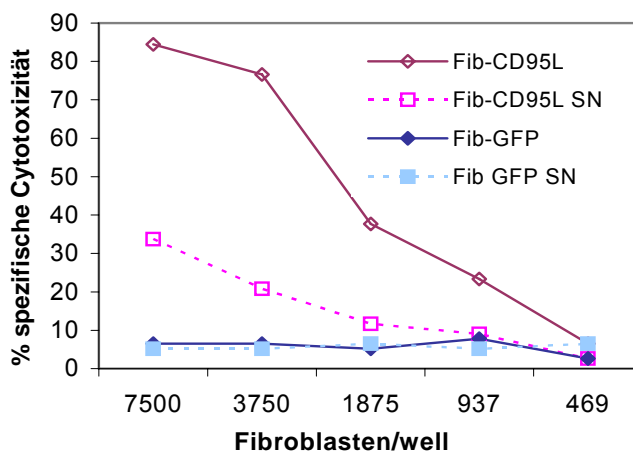
**c. Nachweis von sCD95L im Kulturüberstand von Fib-CD95L.**

Fibroblasten wurden in den angegebenen Zellzahlen/well in einer 96 well Platte ausgesät. Nach 5 Tagen wurde das Medium abgenommen und filtriert. Die Anzahl viabler Fibroblasten wurde durch Auszählen der adherenten Zellen in den wells bestimmt (kursiv). Mittels ELISA erfolgte der Nachweis von sCD95L, der quantitativ anhand einer Standardkurve errechnet wurde.



### 3.2.3.1 Biologische Aktivität CD95L-transduzierter Fibroblasten

Die biologische Aktivität von Fib-CD95L wurde untersucht, indem die Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen mit CD95L sensitiven Jurkatzellen kokultiviert wurden. Obwohl die Oberflächenexpression von CD95L gering war, konnte in den Kokulturen überraschend eine hohe spezifische Zytotoxizität von 85% gegen Jurkat-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.8.). Außerdem wurden Jurkatzellen mit Kulturüberstand der CD95L transduzierten Fibroblasten inkubiert, um die Funktionalität des löslichen CD95L zu testen. Auch durch sCD95L ließ sich Apoptose in den Targetzellen induzieren, wenn auch in einer deutlich geringeren Intensität von maximal 35% im Vergleich zu Fib-CD95L (Abb. 3.8.).



**Abb. 3.8.**  
**CD95L transduzierte Fibroblasten induzieren Apoptose in Jurkat-Zellen.** Fibroblasten wurden in der angegebenen Zellzahl ausgesät. Für den Nachweis biologischer Aktivität wurden die transduzierten Fibroblasten mit je 30000 Jurkat-Zellen kokultiviert. Um die biologische Aktivität des Kulturüberstandes (SN) zu untersuchen, wurden 100µl Fibroblasten-Überstand zu 30000 Jurkat-Zellen (in 100µl) pipettiert. Der Apoptosenachweis in den Jurkat-Zellen erfolgte durch AnnexinV/CD3 Färbung nach 24h. Die Berechnung der spezifischen Zytotoxizität erfolgte wie in 2.2.12.2. beschrieben.

## 3.3 Depletion alloreaktiver T-Zellen durch CD95L exprimierende Zellen

Das Projekt der Depletion alloreaktiver T-Zellen beinhaltet die Ziele, effektiv allospezifische Proliferation und Zytotoxizität zu reduzieren und gleichzeitig funktionelle regulatorische T-Zellen ( $CD4^+CD25^+T_{reg}$ ) zu erhalten. Dem lag die Vorstellung zugrunde, dass residuale Alloreaktivität durch überlebende alloreaktive T-Zellen dauerhaft durch  $T_{reg}$  supprimiert werden könnte.

Die Absicht, allo-aktivierte T-Zellen durch CD95L vermittelte Apoptose selektiv zu depletieren, beruht auf der Erwartung, dass aktivierte T-Zellen im Gegensatz zu nicht aktivierten Zellen sensitiv für diesen Apoptoseweg sind (Klas *et al.*, 1992).

Für unsere Untersuchungen waren außerdem folgende grundsätzliche Aspekte von Bedeutung, die bisher nicht eindeutig geklärt und zu berücksichtigen waren:

1. Zum einen wurde postuliert, dass T-Zellen, in denen Apoptose induziert werden sollte, vorher durch Antigene der CD95L exprimierenden Zellen selbst stimuliert worden sein mussten, die Apoptoseinduktion also antigenspezifisch erfolgt (Lenardo et al. 1999, Strauß et al. 2007).

Als Konsequenz müssten die gleichen Zellen zur Stimulation und zur Apoptoseinduktion verwendet werden.

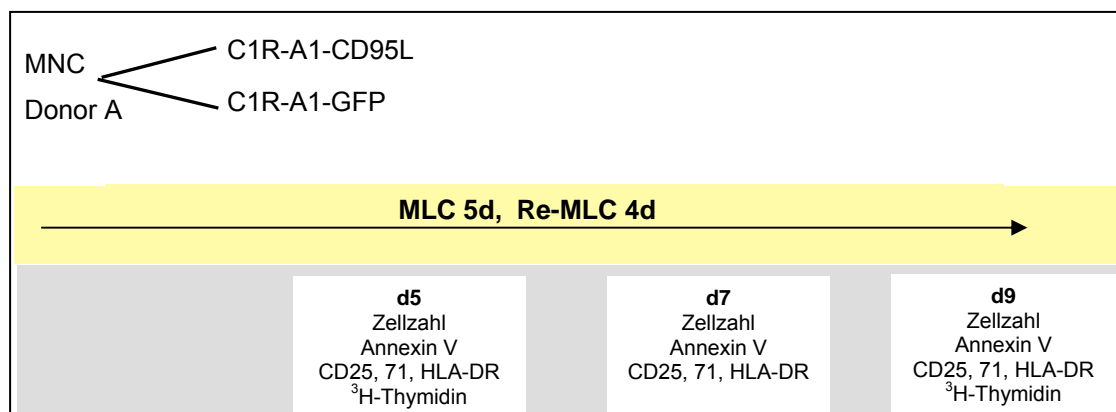
2. Andere experimentelle Befunde wiederum legten nahe, dass die Apoptoseinduktion unabhängig von den stimulierenden Antigenen, erfolgen kann (Dulat et al. 2001, O'Flaherty et al. 1997, Lau et al. 1996).

Danach wäre es möglich, zur Stimulation und zur Apoptoseinduktion unterschiedliche Zellen zu verwenden.

### 3.3.1 Funktionelle Untersuchungen von C1R-A1-CD95L Stimulatorzellen in der gemischten Lymphozytenkultur (MLC)

Zunächst wurde von einer antigenspezifischen Apoptoseinduktion durch CD95L exprimierende Stimulatorzellen ausgegangen: C1R-A1-CD95L Zellen wurden gleichzeitig zur Stimulation als auch zur Apoptoseinduktion eingesetzt. Hierzu wurden Lymphozyten (NK depletierte MNC, s. Abschnitt 2.2.8) mit CD95L transduzierten C1R-A1-Zellen und mit Vektor-transduzierten C1R-A1<sup>GFP</sup> Zellen kokultiviert.

Einen schematischen Überblick über den Versuchsaufbau gibt Abb. 3.9.

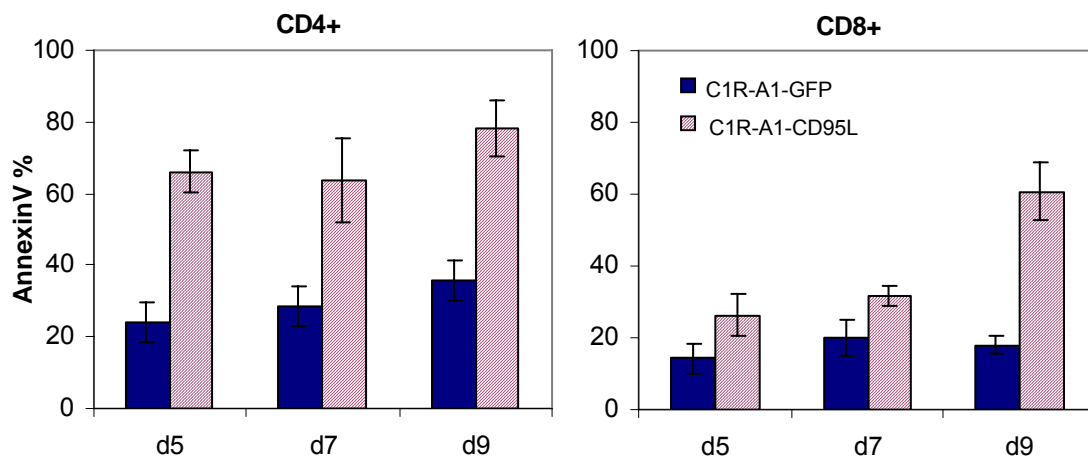


**Abb. 3.9.**

**Schematische Übersicht des Versuchsaufbaus:** MNC (Donor A) wurden mit C1R-A1-CD95L oder C1R-A1-GFP Zellen für 5 Tage mit einer MNC/Stimulatorratio von 2:1 stimuliert und viable Zellen anschließend für 4 Tage mit den gleichen Stimulatorzellen restimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Apoptose, Aktivierungsmarker und Proliferation untersucht.

### 3.3.1.1 C1R-A1-CD95L Stimulatorzellen induzieren Apoptose in T-Zellen

In Vorarbeiten war gezeigt worden, dass allo-aktivierte T-Zellen sensitiv für CD95-Antikörper vermittelte Apoptose waren (Abschnitt 3.1.1., Abb. 3.1. b). In den folgenden Untersuchungen sollte untersucht werden, ob auch C1R-A1-CD95L Zellen in der Lage waren, Apoptose in diesen T-Zellen zu induzieren. Hierzu wurde die Annexin V Rate von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur mit C1R-A1-CD95L untersucht. Bei Stimulation mit C1R-A1-CD95L war die Rate apoptotischer CD4<sup>+</sup> Zellen mehr als doppelt so hoch wie die der Kontrollkulturen (C1R-A1<sup>GFP</sup>) (Abb. 3.10.). Ebenso zeigten CD8<sup>+</sup> Zellen eine erhöhte Apoptoserate nach Kokultivierung mit CD95L transduzierten Stimulatorzellen. Aufgrund ihrer zunächst geringeren Sensitivität für CD95L vermittelte Apoptose (s. Abschnitt 3.1.1) war die Apoptose im Vergleich zu CD4<sup>+</sup> Zellen bis Tag 7 geringer, CD8<sup>+</sup> zeigten aber ab Tag 9 eine mit CD4<sup>+</sup> Zellen vergleichbare, hohe Apoptoserate in Kulturen mit C1R-A1-CD95L (Abb. 3.10).



**Abb. 3.10.**

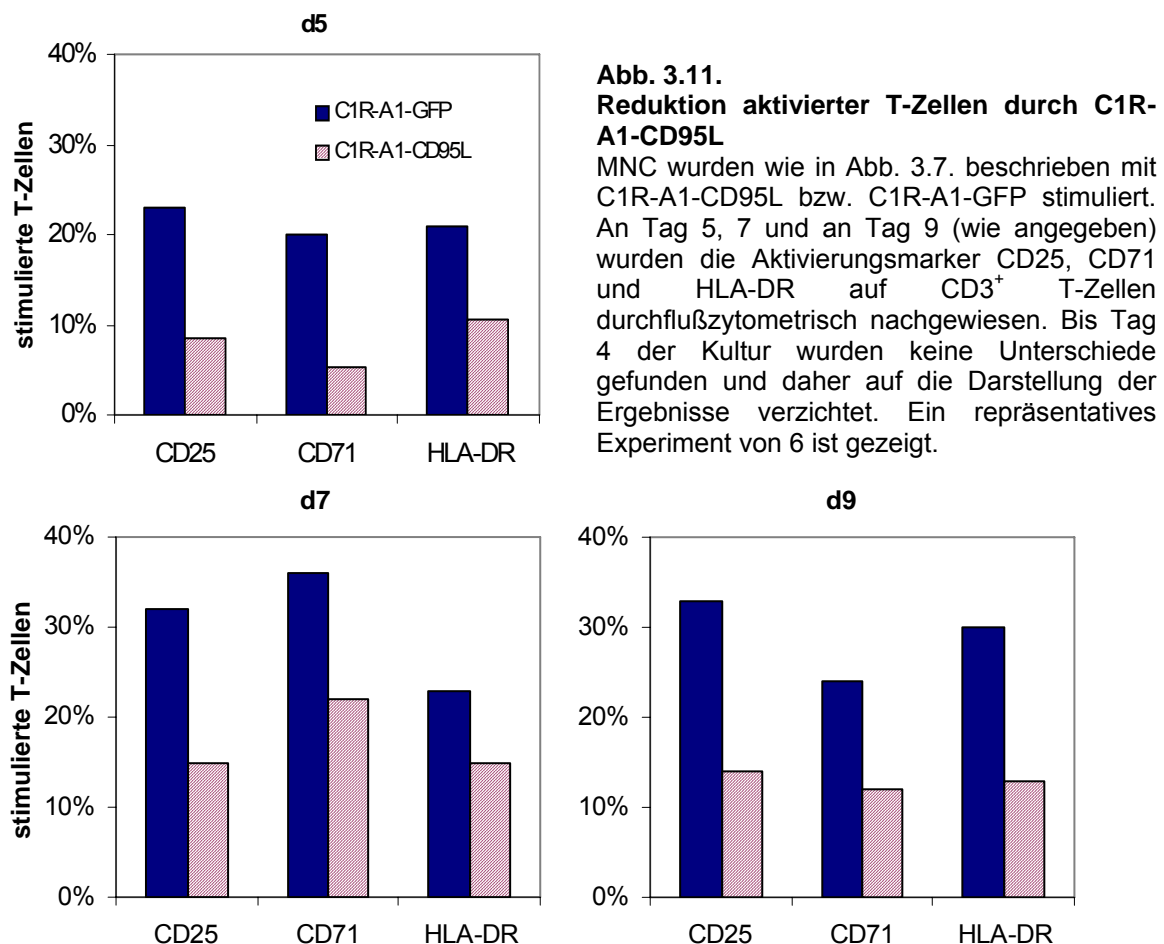
**Induktion von T-Zell Apoptose durch C1R-A1-CD95L.** MNC wurden mit C1R-A1-CD95L bzw. mit C1R-A1-GFP, wie in Abb. 3.7. beschrieben, kokultiviert und an d5 restimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten erfolgte die Analyse apoptotischer T-Zellen nach AnnexinV/CD4 bzw. CD8 Doppelfärbung im Durchflußzytometer. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 6 unabhängigen Experimenten.

### 3.3.1.2 CD95L exprimierende C1R-A1 Zellen reduzieren die Anzahl

#### Aktivierungsmarker positiver T-Zellen

Die Untersuchung der Aktivierungsmarker CD25, CD71 und HLA-DR während der MLC sollte zeigen, ob die Anzahl aktivierter T-Zellen durch C1R-A1-CD95L reduziert wurde.

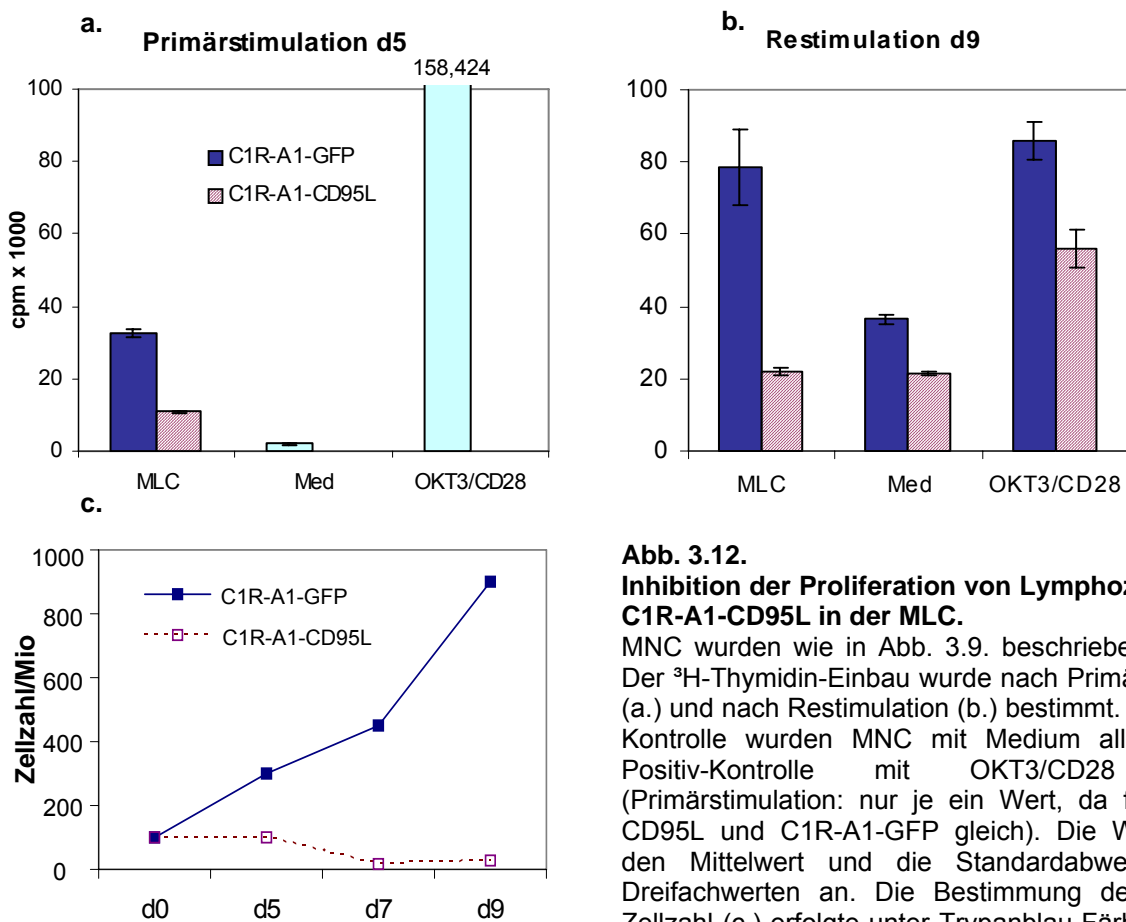
Die Expression von Aktivierungsmarkern variierte auch in mit C1R-A1<sup>GFP</sup> stimulierten T-Zellen von Experiment zu Experiment. Bis Tag 4 der Kultur konnten wie erwartet keine Unterschiede zwischen C1R-A1<sup>GFP</sup> und C1R-A1-CD95L aktivierten T-Zellen gefunden werden (nicht gezeigt), da alloaktivierte T-Zellen erst nach 5 Tagen Stimulation apoptosesensitiv werden (Abb. 3.1.). In allen Experimenten wurde jedoch ab dem 5. Tag eine Reduktion der aktivierten T-Zellen um 30-70% nach C1R-A1-CD95L im Vergleich zur C1R-A1<sup>GFP</sup> Stimulation nachgewiesen (Abb. 3.11). Zu beachten ist, dass aus technischen Gründen in diesen Experimenten keine Annexin-Gegenfärbungen durchgeführt werden konnten, so dass keine Aussage über die Viabilität der Aktivierungsmarker positiven Zellen möglich ist.



### 3.3.1.3 C1R-A1-CD95L inhibieren die Proliferation von T-Zellen in der MLC

Der Einfluß von C1R-A1-CD95L auf die Proliferation von T-Zellen wurde im zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur durch Messung des <sup>3</sup>H-Thymidin Einbaus und durch die Bestimmung der absoluten Zellzahl untersucht. Dabei dienten T-Zellen, die mit C1R-A1<sup>GFP</sup> stimuliert worden waren, als Kontrolle.

In Kulturen mit C1R-A1-CD95L war die T-Zell-Proliferation nach 5 Tagen auf 30% der Kontrollkultur reduziert und entsprach nur noch dem 5-fachen der Medium-Kontrolle, (Abb. 3.12.a.). Nach weiteren 4 Tagen Stimulation mit C1R-A1-CD95L war die Proliferation der T-Zellen auf den Wert der Medium-Kontrolle reduziert. Die Proliferation nach Zusatz von OKT3/CD28 zur polyklonalen Stimulation blieb dagegen erhalten (Abb. 3.12.b.). Die Zellzahlbestimmung über die Kulturdauer hinweg bestätigte das Ergebnis des  $^3\text{H}$ -Thymidin Einbaus: während die T-Zellen der Kontrollkulturen eine normale Proliferation aufwiesen, konnte kein Zell-Wachstum in den C1R-A1-CD95L Kulturen festgestellt werden, die Zellzahl nahm vielmehr ab: von 100 Mio eingesetzten Zellen waren nach der Kultur noch zwischen 2-30 Mio Zellen viabel (Mittelwert: 14,37 Mio, Standardabweichung: 13,2 Mio [aus 6 Experimenten]) (Abb. 3.12.c.).



**Abb. 3.12.**

**Inhibition der Proliferation von Lymphozyten durch C1R-A1-CD95L in der MLC.**

MNC wurden wie in Abb. 3.9. beschrieben stimuliert. Der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbau wurde nach Primärstimulation (a.) und nach Restimulation (b.) bestimmt. Als Negativ-Kontrolle wurden MNC mit Medium allein, für die Positiv-Kontrolle mit OKT3/CD28 kultiviert (Primärstimulation: nur je ein Wert, da für C1R-A1-CD95L und C1R-A1-GFP gleich). Die Werte geben den Mittelwert und die Standardabweichung von Dreifachwerten an. Die Bestimmung der absoluten Zellzahl (c.) erfolgte unter Trypanblau-Färbung an den angegebenen Tagen der Kultur.

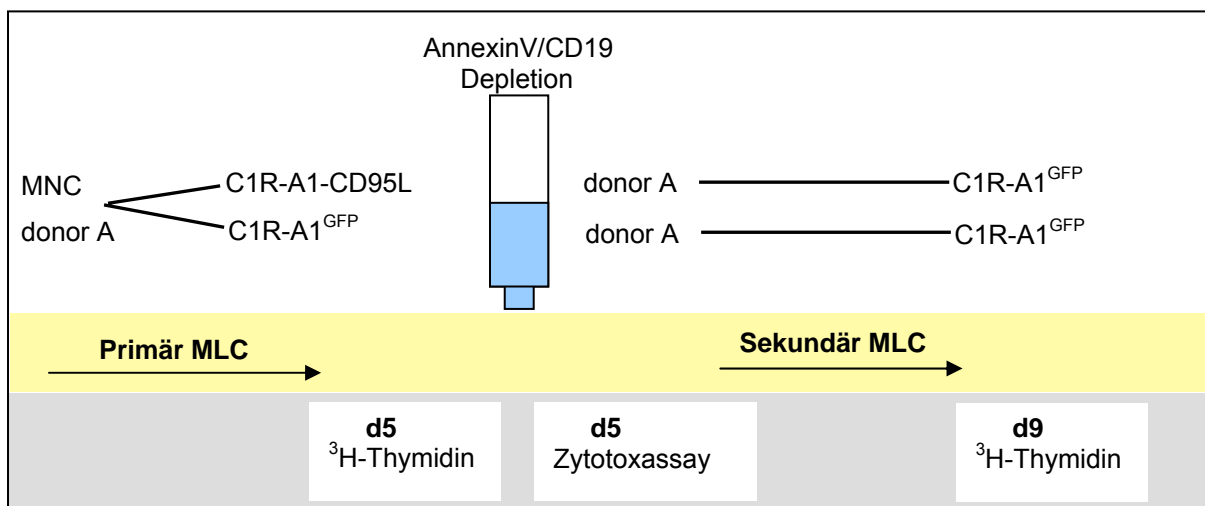
Ein repräsentatives von 6 Experimenten ist gezeigt.

Mit diesen Experimenten konnte demonstriert werden, dass C1R-A1-CD95L Stimulatorzellen die Proliferation der T-Zellen inhibieren. Die Anzahl aktivierter T-Zellen wurde durch C1R-A1-CD95L Kokultur herabgesetzt, während der Anteil apoptotischer  $\text{CD4}^+$  und  $\text{CD8}^+$  Zellen erhöht war.

### 3.3.2 Allospezifische T-Zell-Depletion nach simultaner Stimulation und Apoptoseinduktion mit CD95L exprimierenden C1R-A1 Zellen

Zusammenfassend wurde bislang gezeigt, dass es tatsächlich möglich ist, mit C1R-A1-CD95L Zellen gleichzeitig T-Zellen zu stimulieren und Apoptose zu induzieren. Nun sollte überprüft werden, ob die erhöhte Apoptose alloantigen spezifisch war. Wenn ja, würde eine Restimulation der residualen T-Zellen aus der Primärkultur mit C1R-A1<sup>GFP</sup> Zellen, welche kein CD95L exprimieren, auch zu einer deutlich eingeschränkten Proliferation führen.

Um den Grad der Allodepletion zu überprüfen, wurden Zellen, die mit C1R-A1-CD95L primär stimuliert worden waren, in der Sekundär-MLC mit C1R-A1<sup>GFP</sup> kokultiviert. Als Kontrolle dienten primär mit C1R-A1<sup>GFP</sup> aktivierte T-Zellen. Sowohl zytotoxische Aktivität als auch Proliferation der T-Zellen wurden untersucht. Eine schematische Übersicht des Versuchsaufbaus gibt Abb. 3.13.

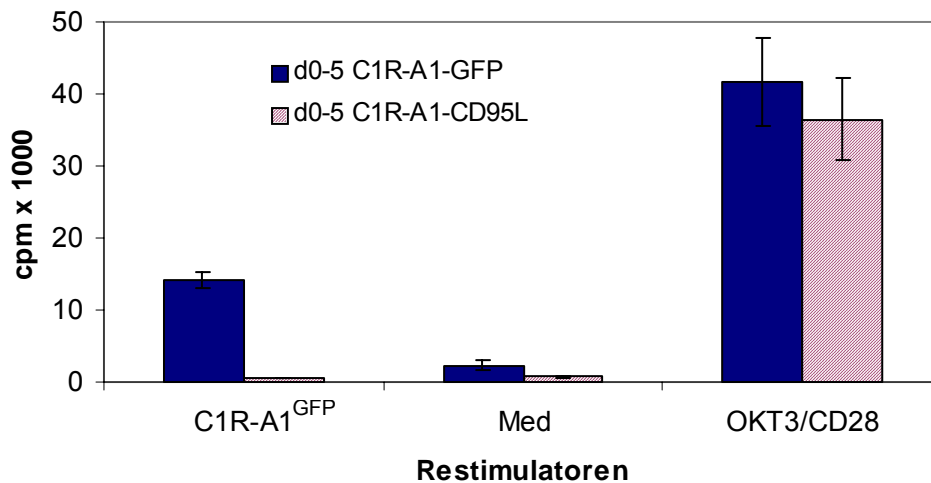


**Abb. 3.13. Schematische Übersicht des Versuchsaufbaus:** Primär-MLC mit C1R-A1-CD95L und C1R-A1<sup>GFP</sup>; Sekundär-MLC mit C1R-A1<sup>GFP</sup>. MNC/Stimulatorratio: 2:1.

#### 3.3.2.1 C1R-A1-CD95L inhibieren die Proliferation allospezifisch aktivierter T-Zellen

Die Proliferation allospezifisch aktivierter T-Zellen wurde durch die Einbaurate von <sup>3</sup>H-Thymidin- bestimmt. Die mit C1R-A1-CD95L primär stimulierten T-Zellen zeigten keine allospezifische Proliferation bei Restimulation mit C1R-A1<sup>GFP</sup> (Abb. 3.14.). Dagegen war die Proliferation auf OKT3/CD28 erhalten. Ebenso wurde für T-Zellen der Kontrollkultur, in der primär und sekundär mit C1R-A1<sup>GFP</sup> stimuliert wurde, eine normale Proliferation gefunden (Abb. 3.14.).

Eine effektive Inhibition der allospezifischen Proliferation durch C1R-A1-CD95L konnte somit belegt werden.



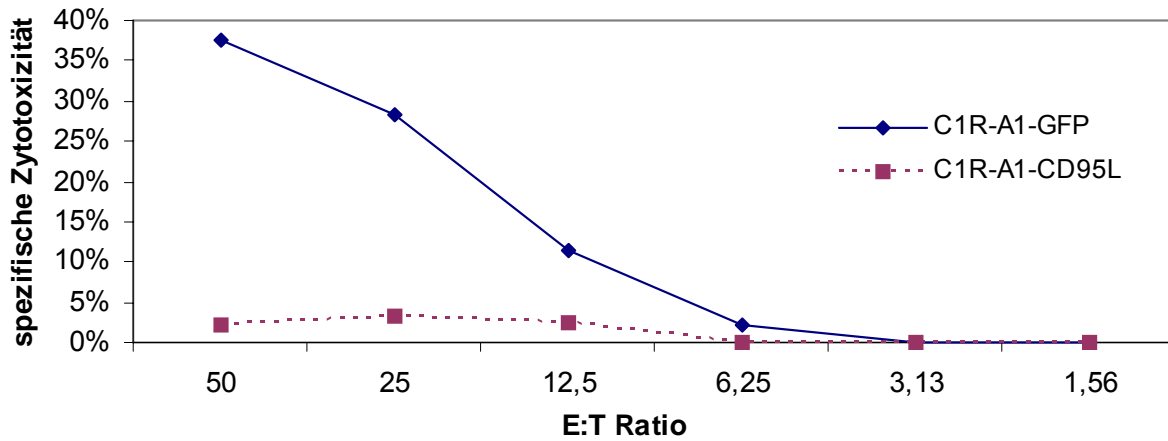
**Abb. 3.14.**

**Inhibition der allospezifischen Proliferation durch C1R-A1-CD95L.**

MNC wurden für die Primärstimulation mit C1R-A1<sup>GFP</sup> (blaue Balken) oder C1R-A1-CD95L (rot schraffierte Balken) stimuliert. Nach Isolierung der lebenden T-Zellen wurden diese wie angegeben restimuliert. An Tag 9 erfolgte die Markierung mit <sup>3</sup>H-Thymidin-Thymidin über 16h. Für die Negativkontrolle wurden die Zellen mit Medium allein, für die Positivkontrolle unter Zugabe von OKT3/CD28 kultiviert. Die Werte geben den Mittelwert und die Standardabweichung von Dreifachwerten an. Ein repräsentatives von 3 unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

### 3.3.2.2 C1R-A1-CD95L reduzieren die alloreaktive Zytotoxizität von T-Zellen

Analog zur Proliferation wurde der Effekt des Kulturverfahrens auf die allospezifische Zytotoxizität untersucht. Die spezifische Zytotoxizität C1R-A1<sup>GFP</sup> stimulierter T-Zellen gegen C1R-A1<sup>GFP</sup> Targets (Maximalkontrolle) betrug 37% nach 20h bei einer E:T-Ratio von 50 (Abb. 3.15.). Dagegen wurde keine Zytotoxizität beobachtet, wenn C1R-A1-CD95L stimulierte Zellen gegen C1R-A1<sup>GFP</sup> - Targets angesetzt wurden.

**Abb. 3.15.****Reduktion der allospezifischen Zytotoxizität durch C1R-A1-CD95L.**

MNC wurden mit C1R-A1-CD95L (rot gepunktete Linie) oder C1R-A1-GFP (blaue Linie) primär stimuliert. Nach Isolierung der lebenden T-Zellen wurden diese gegen C1R-A1-GFP in den angegebenen E:T-Ratios für 20h kokultiviert. Die Auswertung erfolgte nach 20h durch AnnexinV Färbung der GFP positiven Zellen. Ein repräsentatives von 3 unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

Zusammengefasst zeigen diese Experimente, dass T-Zellen nach 5 Tagen Kokultur mit C1R-A1-CD95L Zellen eine fehlende zytotoxische Aktivität gegen die allogenen Stimulatorzellen (nicht CD95L exprimierende C1R-A1<sup>GFP</sup>) aufwiesen und durch diese Zellen nicht mehr aktivierbar waren. Damit ist klar belegt, dass alloreaktive T-Zellen in diesem System effektiv depletiert wurden.

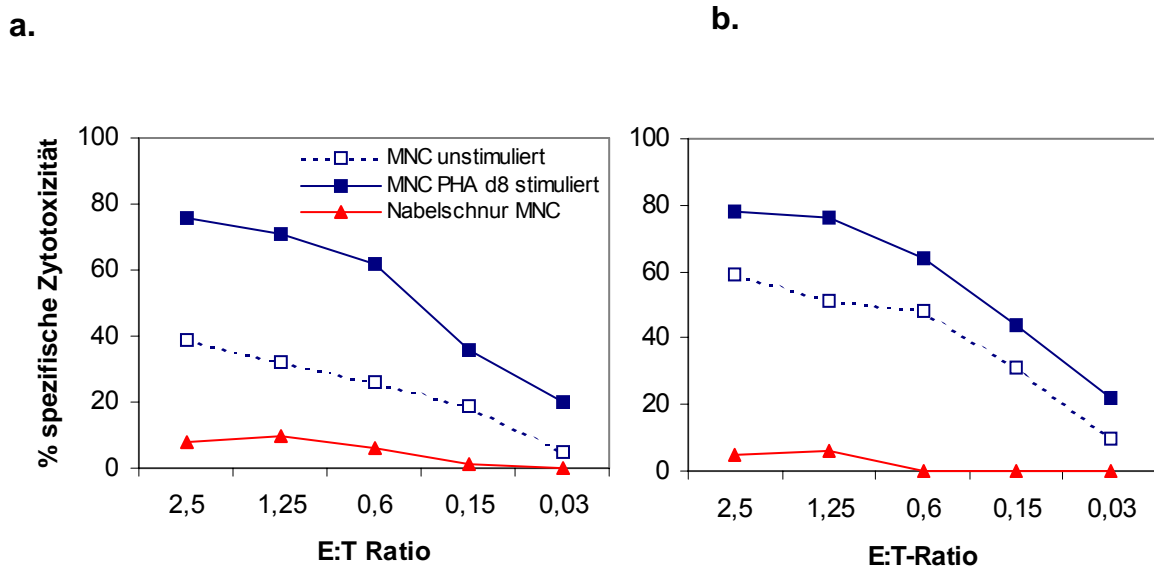
**3.3.2.3 Bystandereffekt durch C1R-A1-CD95L bzw. C1R-CD95L:****Zytotoxizität gegen nicht aktivierte T-Zellen**

Obwohl die Zellen nach Kokultivierung mit CD95L transduzierten C1R / C1R-A1 Zellen funktional und durch OKT3/CD28 und 3<sup>rd</sup>-party Zellen stimulierbar waren, war der Zellertrag gering: 70-98% (Mittelwert: 85,6%, Standardabweichung: 13,22%) der eingesetzten Zellen waren nach der Kultur apoptotisch. Da der Anteil alloreaktiver T-Zellen zwischen 1-10% liegt (Janeway und Travers, 2005), konnte der geringe Zellertrag nicht mit der Apoptose allogen aktivierter T-Zellen allein erklärt werden. Um zu evaluieren, ob dieser unerwünschte Effekt durch Zytotoxizität gegen nicht aktivierte (ruhende) T-Zellen bedingt war, wurden CD95L-tranduzierte C1R- (Abb. 3.16.a.) und C1R-A1- (Abb. 3.16.b.) Zellen mit stimulierten MNC inkubiert und die Zytotoxizität mit der gegen nicht stimulierte MNC des gleichen Spenders sowie gegen Nabelschnur MNC verglichen. Die Zytotoxizität gegen aktivierte MNC betrug in beiden Ansätzen maximal knapp 80%. Im Gegensatz zu der ursprünglichen Annahme, dass nicht aktivierte



(ruhende) T-Zellen resistent gegen CD95L vermittelte Apoptose sind (Klas *et al.*, 1993), konnte hier eine Zytotoxizität von maximal 40% (C1R-CD95L-Effektoren) bzw. 60% (C1R-A1-CD95L Effektoren) nachgewiesen werden, wenn unstimulierte MNC als Target verwendet wurden. Dagegen konnte gegen Nabelschnur-MNC keine Zytotoxizität gefunden werden.

Somit muss davon ausgegangen werden, dass bei T-Zell-Stimulation durch CD95L exprimierende C1R- bzw. C1R-A1- Zellen unspezifisch auch eine Induktion von Apoptose in nicht aktivierten T-Zellen stattfindet. Die Zytotoxizität gegen nicht aktivierte (Bystander) T-Zellen ist daher offensichtlich verantwortlich für die geringe Ausbeute viabler Zellen nach Inkubation mit CD95L transduzierten C1R/C1R-A1 Zellen.



**Abb. 3.16. Bystanderzytotoxizität durch C1R-CD95L (a) und C1R-A1-CD95L (b).** Unstimulierte Buffy-Coat MNC, mit PHA stimulierte MNC (d8) des gleichen Spenders und unstimulierte Nabelschnur-MNC (Targets) wurden für 8h mit C1R-CD95L (a) bzw. C1R-A1-CD95L (b)-Zellen (Effektoren) in den angegebenen Effektor/Target (E:T) Ratios kokultiviert. Die Analyse apoptotischer T-Zellen erfolgte nach AnnexinV/CD3 Färbung im Zytometer. Gezeigt ist eines von 2 Experimenten.

### **3.3.3 Allodepletion durch lentiviral CD95L-transduzierte Fibroblasten nach primärer Stimulation mit EBV-B-Zellen des gleichen Spenders**

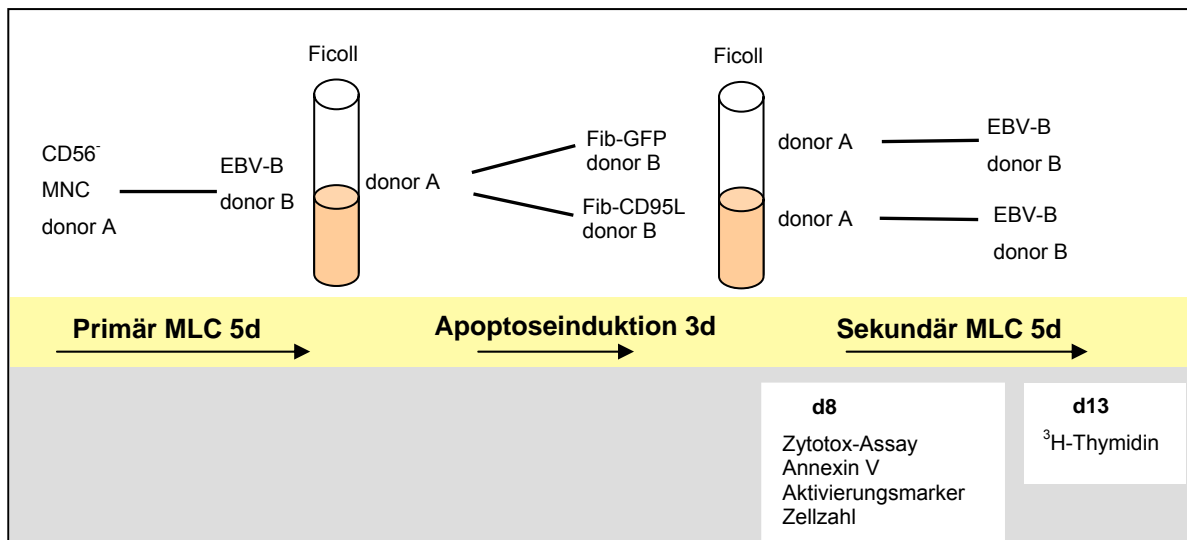
Zusammenfassend war bislang gezeigt worden, dass durch CD95L exprimierende C1R-A1 Zellen eine allogene Stimulation von T-Zellen erreicht und gleichzeitig in aktivierten T-Zellen Apoptose induziert wurde. Stimulation und Apoptoseinduktion erfolgte in dieser Kultur durch die gleichen Zellen. Dieser Ansatz eignet sich jedoch nicht für eine mögliche klinische Applikation, bei der als Ziel eine empfängerspezifische Alloaktivierung von Spender-T-Zellen und die selektive Depletion dieser Zellen erfolgen muss. C1R-A1-Zellen exprimieren nicht individuell die HLA-Merkmale der Empfänger, sondern stimulieren HLA-A1-spezifisch. Auch wäre die Prozedur einer individuellen CD95L-Transduktion nach vorangehender Apoptoseresistenzentwicklung in B-Zell-Linien des Empfängers zu komplex. Als Alternative zu B-Zellen wurden geprüft, ob konstitutiv apoptoseresistente, CD95L transduzierte Fibroblasten (s. Abb. 3.6, 3.7.) für die Apoptose-Induktion in Frage kamen. Fibroblasten eignen sich allerdings nicht als alloantigen-präsentierende Zellen. Um dieses Problem zu umgehen, wurde als Alternative zum bisherigen „simultanen“ Kultursystem, bei dem Alloantigen-Stimulation und Apoptoseinduktion durch die gleiche Zelle und in einem einzigen Kulturansatz erfolgte, ein „sequentielles“ Kultursystem geprüft. Hierbei erfolgte zunächst die Aktivierung der T-Zellen und in einer 2. Phase die Zusetzung CD95L-exprimierender Fibroblasten (Fib-CD95L) zur Apoptoseinduktion. Da nicht geklärt war, ob für CD95L vermittelte Apoptose eine simultane TCR-MHC Bindung stattfinden müsse, sollten Stimulatoren und Apoptoseinduktoren HLA-identisch sein.

EBV-B-Zellen wurden dabei zur Stimulation und CD95L transduzierte Fibroblasten des gleichen Spenders zur Apoptoseinduktion verwendet (s. auch Einleitung, Abb. 1.5.b).

#### **3.3.3.1 Reduktion der allospezifischen Reaktivität durch CD95L exprimierende Fibroblasten nach Primärstimulation mit EBV-B-Zellen**

Um zu prüfen, ob Fib-CD95L in der Lage sind, allogen aktivierte T-Zellen zu depletieren wurden MNC (Donor A) zunächst für 5 Tage mit EBV-B-Zellen (Donor B) stimuliert. Die Zellen wurden anschließend in eine mit transduzierten

Fibroblasten (Donor B) bewachsenen Kulturflasche übertragen und für 3 Tage kokultiviert. Zur Kontrolle wurden allogene aktivierte MNC mit Vektor-transduzierten Fibroblasten (Fib-GFP) kokultiviert. An Tag 8 wurden viable T-Zellen mit den primären EBV-B-Stimulatorzellen für 5 Tage restimuliert, um residuale cytotoxische und proliferative Aktivität gegenüber Donor B zu untersuchen. Eine schematische Übersicht des Versuchsaufbaus gibt Abb. 3.17.



**Abb. 3.17.**

**Schematische Übersicht des Versuchsaufbaus:** Primärstimulation von MNC (donor A) mit allogenen EBV-B Zellen (donor B), Apoptoseinduktion durch Fib-CD95L (donor B), anschließend Restimulation mit EBV-B (donor B).

T-Zellen, die nach primärer Alloaktivierung mit CD95L-exprimierenden Fibroblasten inkubiert wurden, zeigten eine deutlich höhere Annexin V Rate sowohl in CD8 als auch in CD4 positiven Zellen im Vergleich zu T-Zellen, die mit Vektor-transduzierten Fibroblasten kokultiviert wurden (Abb. 3.18.a.). Auch die Expression von Aktivierungsmarkern war im Vergleich zur Kontrollkultur (Fib-GFP) erniedrigt (Abb. 3.18.b.).

Nach Restimulation mit den primären EBV-B-Zellen war die Proliferation deutlich reduziert, sie wies nur noch den 1,5fachen Mediumwert auf (Abb. 3.18.c.).

Die zytotoxische Aktivität der mit Fib-CD95L inkubierten T-Zellen wurde nach 20h Kokultivierung mit EBV-B-Zellen untersucht. Während T-Zellen, die mit Fib-GFP inkubiert wurden, eine spezifische Zytotoxizität von 18% zeigten, betrug die spezifische Zytotoxizität nach Inkubation mit Fib-CD95L nur maximal 8% (Abb. 3.18.d.).

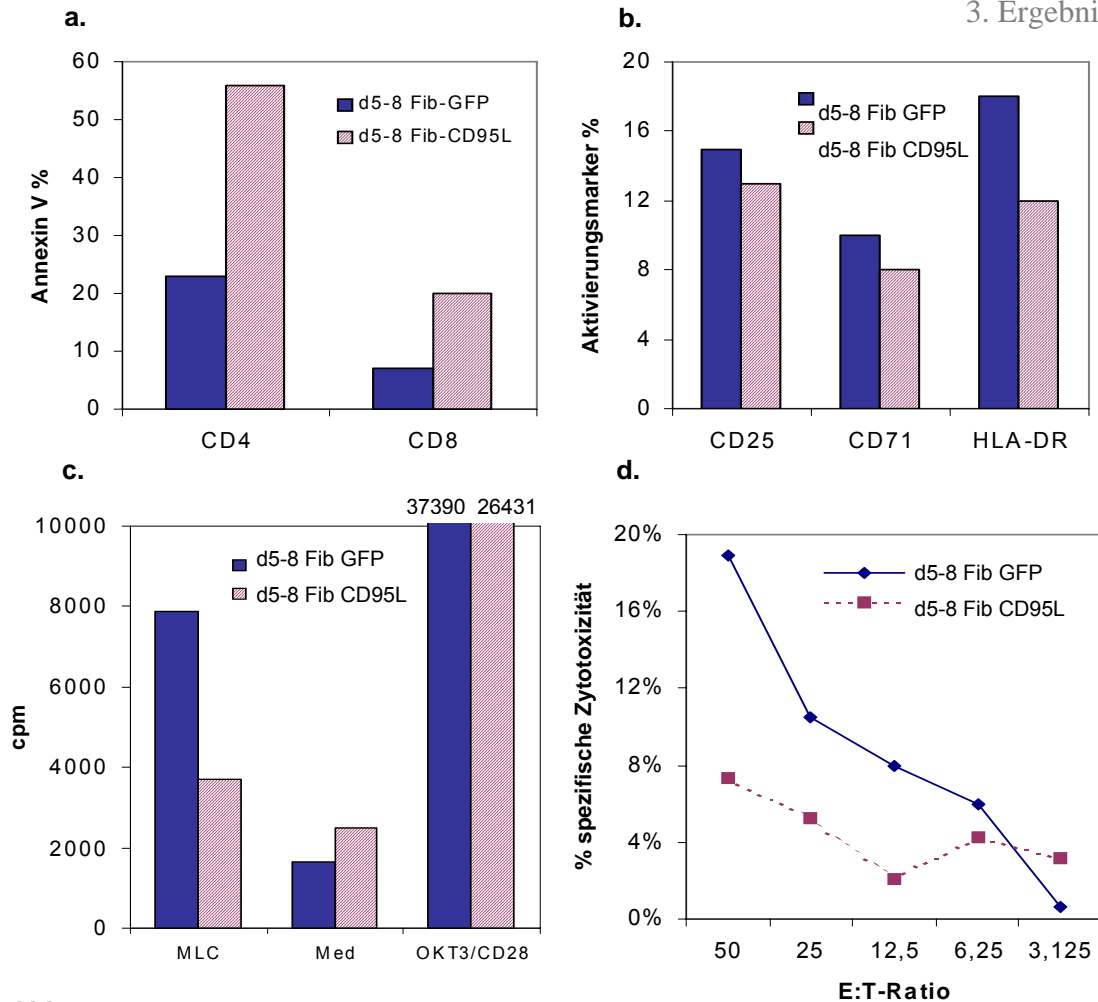


Abb. 3.18.

**Depletion allo-stimulierter T-Zellen durch CD95L exprimierende Fibroblasten nach Primärstimulation mit EBV-B-Zellen.** **a. Apoptosedetektion.** An d8 wurden Annexin V positive  $CD4^+$  bzw  $CD8^+$  T-Zellen durchflußzytometrisch bestimmt. **b. Aktivierungsmarker.** Der Anteil CD25, CD71 und HLA-DR positiver  $CD3^+$ -T-Zellen wurde an Tag 8 durchflußzytometrisch bestimmt. **c. Inhibition der Proliferation nach Inkubation mit Fib-CD95L.** An d8 wurden viable T-Zellen isoliert und mit den für die Primärstimulation verwendeten EBV-B Zellen für 5 Tage restimuliert. Die proliferative Aktivität wurde durch Einbau von  $^3H$ -Thymidin bestimmt. **d. Inhibition der cytotoxischen Aktivität durch Inkubation mit Fib-CD95L.** Nach Isolierung der lebenden T-Zellen an d8 wurden diese für 24h mit den primären EBV-B Stimulatorzellen (Targets) in den angegebenen E:T Ratios kokultiviert. Die Auswertung erfolgte durch Annexin V Färbung CaAM positiver Target-Zellen.

Zusammengefasst zeigen diese Resultate, dass trotz niedriger CD95L Oberflächenexpression der transduzierten Fibroblasten eine Reduktion der allospezifischen Reaktivität erreicht wurde. Hierzu trug mit großer Wahrscheinlichkeit auch die Freisetzung von sCD95L ins Kulturmedium bei. Allerdings war die Effektivität der Allopeletion geringer als unter Verwendung von C1R-A1-CD95L Zellen im "simultanen" Kulturansatz.

Im Rahmen des Experimentes wurde gezeigt, dass die allospezifische Depletion im sequentiellen Kultursystem nach Primärstimulation mit EBV-B-Zellen und nachfolgender Apoptoseinduktion durch Fib-CD95L des gleichen

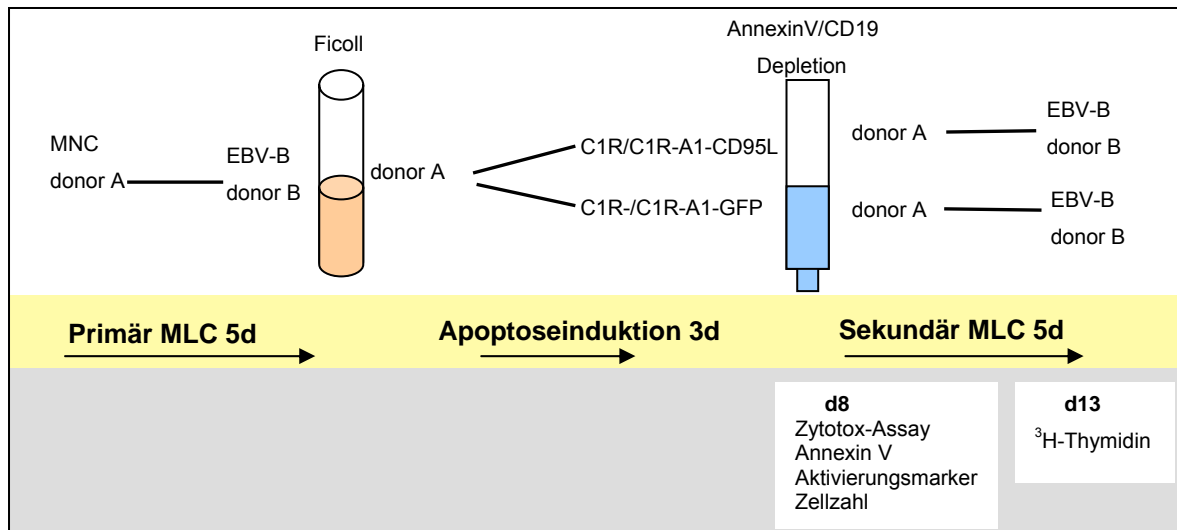
Spenders prinzipiell möglich ist. Aktivierung und Apoptoseinduktion müssen somit nicht durch dieselben Zellen vermittelt werden.

#### **3.3.4 Allodepletion im sequentiellen System mit CD95L transduzierten C1R-Zellen bzw. C1R-A1-Zellen nach Stimulation mit EBV-B-Zellen.**

Es war prinzipiell gezeigt worden, dass ein sequentielles Kultursystem ebenfalls zur Depletion alloreaktiver T-Zellen verwendet werden kann. Daher sollte geklärt werden, ob durch Verwendung von C1R- bzw. C1R-A1-CD95L im Vergleich zu Fib-CD95L die Effektivität im sequentiellen Kulturansatz gesteigert werden könnte. Voraussetzung für die Effektivität eines solchen Systems war, dass der Apoptosemechanismus antigen-unspezifisch alle aktivierten T-Zellen erfassen würde und HLA-Identität von Stimulator- und apoptoseinduzierenden Zellen nicht gegeben sein musste.

Im Hinblick auf eine mögliche klinischen Anwendung wäre ein solcher Ansatz von großem Vorteil, da nach individueller, HLA-spezifischer Aktivierung *eine* CD95L exprimierende Zell-Linie zur Apoptoseinduktion der aktivierten T-Zellen genutzt werden könnte.

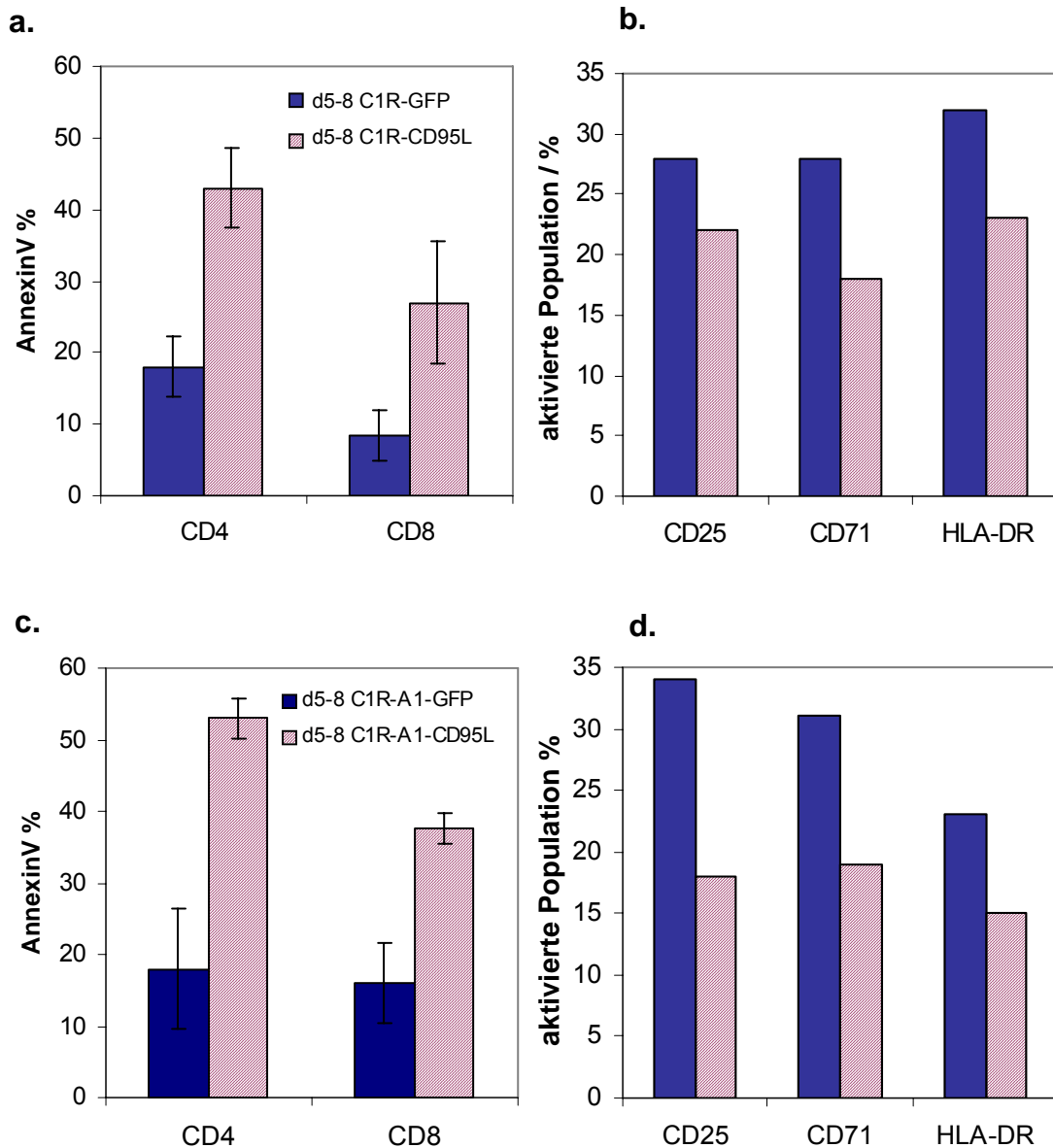
Es wurde ein sequentielles System gewählt, in dem EBV-transformierte B-Zell-Linien bekannter HLA-Konstellation als primäre Stimulatorzellen verwandt und CD95L transduzierte C1R/C1R-A1 Zellen (HLA different zu den EBV-B Stimulatoren) nach der allogenen Stimulation zur Apoptoseinduktion eingesetzt wurden. Die Versuchsanordnung ist in Abb. 3.19 dargestellt. Nach 5 tägiger Allostimulation und nachfolgender Apoptoseinduktion über 3 Tage wurden viable T-Zellen durch magnetische Depletion mit AnnexinV/anti-CD19 selektioniert. Anschließend wurde die cytotoxische Aktivität und Proliferation der selektionierten T-Zellen gegen die primären EBV-B-Stimulatorzellen bestimmt.



**Abb. 3.19. Schematische Übersicht des Versuchsaufbaus:** Primärstimulation MNC (Donor A) mit allogenen EBV-B Zellen (Donor B) (MNC/Stimulatorenratio: 2:1), Apoptoseinduktion durch C1R-/C1R-A1-CD95L (T-Zell/Apoptoseinduktorenratio: 2:1), anschließend Restimulation mit EBV-B-Zellen (Donor B) (MNC/Stimulatorenratio: 2:1).

#### 3.3.4.1 C1R-CD95L und C1R-A1-CD95L Zellen induzieren Apoptose und reduzieren aktivierte T-Zellen nach EBV-B-Zell-Stimulation

Nach Primärstimulation mit EBV-B-Zellen und sequentieller Apoptoseinduktion mit C1R-CD95L/C1R-A1-CD95L, wurde an Tag 8 die Apoptose von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen durch Annexin V Färbung und die Expression von Aktivierungsmarkern auf CD3<sup>+</sup> T-Zellen untersucht. Als Kontrolle wurde die Inkubation von d5-d8 mit C1R<sup>GFP</sup> bzw C1R-A1<sup>GFP</sup> durchgeführt. Wie aus Abb. 3.20. ersichtlich, ist die Apoptoserate sowohl der CD4<sup>+</sup> als auch der CD8<sup>+</sup> Zellen nach Inkubation mit CD95L transduzierten C1R-/C1R-A1 Zellen im Vergleich zur GFP-Kontrollkultur deutlich erhöht. Die Anzahl der Aktivierungsmarker CD25, CD71 und HLA-DR-positiven T-Zellen war nach CD95L-Exposition um 10-15% reduziert (auch hier musste wie im simultanen System aus technischen Gründen auf eine AnnexinV Gegenfärbung verzichtet werden, so dass keine Aussage über die Viabilität der Aktivierungsmarker-positiven Zellen möglich ist). Insgesamt waren Apoptose und Reduktion der aktivierten T-Zellen höher nach Inkubation mit C1R-A1-CD95L als mit C1R-CD95L. Alle weiteren Experimente wurden daher mit C1R-A1-CD95L durchgeführt.

**Abb. 3.20.**

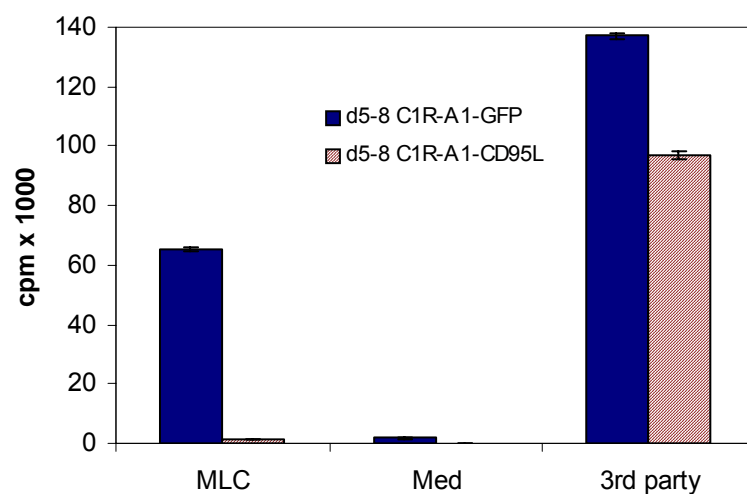
**Apoptoseinduktion und Reduktion der Aktivierungsmarker durch C1R-CD95L bzw. C1R-A1-CD95L Exposition nach Primärstimulation mit allophenen EBV-B-Zellen**

**a.** Nach Apoptoseinduktion durch C1R-CD95L von d5-8 wurde AnnexinV auf CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen durchflußzytometrisch bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten. **b.** Die angegebenen Aktivierungsmarker wurden an d8 unter Gegenfärbung von CD3 bestimmt (Ein repräsentatives von 3 Experimenten). **c./d.** Experimente entsprechend a./b. mit C1R-A1 – CD95L und C1R-A1<sup>GFP</sup>.

### 3.3.4.2 C1R-A1-CD95L Zellen reduzieren allospezifische Aktivität nach Primärstimulation mit EBV-B-Zellen

Als nächstes wurde die Effektivität des sequentiellen Kultursystems funktionell untersucht. Hierzu wurden nach Apoptoseinduktion zytotoxische Aktivität und Proliferation der residualen T-Zellen gegen die ursprünglichen EBV-B-Stimulatoren ermittelt.

Nach Primärstimulation mit EBV-B-Zellen und 3 Tagen Apoptoseinduktion durch C1R-A1-CD95L zeigten die T-Zellen keine Proliferation nach Restimulation mit den ursprünglichen EBV-B-Zellen, die  $^3\text{H}$ -Thymidin Werte lagen im Bereich der Medium-Kontrolle. Die Kontroll-T-Zellen (mit C1R-A1<sup>GFP</sup> inkubiert) wiesen hingegen normal hohe Werte auf. Die Proliferation gegenüber einem Pool fremder HLA-Antigene (3<sup>rd</sup>-party Zellen), blieb in den C1R-A1-CD95L inkubierten T-Zellen erhalten, wenn auch im Vergleich zu den Kontrollzellen leicht reduziert (Abb. 3.21.).



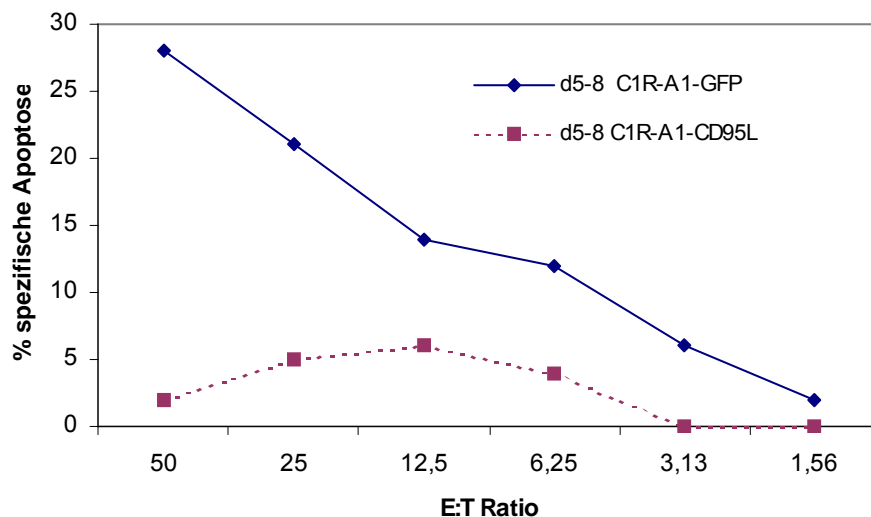
**Abb. 3.21.**

**Inhibition der allospezifischen T-Zell Proliferation. Primärstimulation mit EBV-B-Zellen und anschließende Kokultur mit C1R-A1-CD95L**

MNC (donor A) wurden für 5 Tage mit allogenen EBV-B-Zellen (Donor B) stimuliert und anschließend für 3 Tage (d5-8) entweder mit C1R-A1-GFP oder mit C1R-A1-CD95L kokultiviert. Nach Isolierung der lebenden T-Zellen an d8 erfolgte die Restimulation mit EBV-B-Zellen (Donor B). An d13 wurde die proliferative Aktivität durch Bestimmung des  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbaus untersucht. Für die Negativkontrolle wurden die Zellen mit Medium, für die Positivkontrolle mit 3<sup>rd</sup> party Zellen kultiviert. Die Werte geben den Mittelwert und die Standardabweichung aus jeweils 3 wells eines repräsentativen von 3 unabhängigen Experimenten an.



Zur Bestimmung der allospezifischen Zytotoxizität nach C1R-A1-CD95L/C1R-A1<sup>GFP</sup> Inkubation, wurden die T-Zellen mit EBV-B-Zellen als Targets für 20h kokultiviert. Nach CD95L Exposition konnte keine cytotoxische Aktivität nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu zeigten mit C1R-A1<sup>GFP</sup> stimulierte T-Zellen eine spezifische Zytotoxizität von maximal 28% (Abb. 3.22.).



**Abb. 3.22.**

**Inhibition der zytotoxischen Alloreaktivität durch C1R-CD95L nach Primärstimulation mit EBV-B-Zellen**

CD56<sup>+</sup> MNC wurden stimuliert wie in Abb. 3.19. beschrieben. Nach Apoptoseinduktion (d5-8 C1R-A1-CD95L) und Isolierung der lebenden T-Zellen an d8 wurden die Zellen für 20h mit den für die Primärstimulation eingesetzten, CaAM markierten EBV-B-Zellen kokultiviert. Die Apoptosedetektion erfolgte durch AnnexinV Färbung der CaAM positiven Zellen. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen von d5-d8 mit C1R<sup>GFP</sup> inkubiert. Ein repräsentatives von 3 unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass auch nach sequentieller Aktivierung und Apoptoseinduktion durch HLA-differente Zellpopulationen eine effektive Depletion alloreaktiver T-Zellen erreicht wurde. Im Vergleich zu den Resultaten, die unter Verwendung von CD95L exprimierenden Fibroblasten erzielt werden konnten, war die Effektivität dieses Systems deutlich höher, was auf die höhere Oberflächenexpression von CD95L durch transduzierte C1R/C1R-A1 Zellen zurückgeführt werden kann. Darüberhinaus war die Effektivität des sequentiellen Systems vergleichbar, wenn nicht sogar höher wie vorher beschrieben im simultanen Kultursystem (Abschnitt 3.3.2.1).

### 3.3.5 Zusammenfassung: Depletion alloreaktiver T-Zellen durch CD95L exprimierende Zellen

Die Depletion alloreaktiver T-Zellen mithilfe CD95L transduzierter Zellen konnte in allen experimentellen Ansätzen nachgewiesen werden. Dabei war der Einsatz retroviral transduzierter EBV-B-Zellen (Vorversuche, Abschnitt 3.1.2) wenig effektiv, wahrscheinlich aufgrund der Apoptosesensitivität sowie ihrer relativ geringen Expression von CD95L. Die lentivirale Transduktion apoptoseresistenter C1R- /C1R-A1 Zellen führte dagegen zu einer stabilen Oberflächenexpression von CD95L. Nach Verwendung von C1R-A1-CD95L Zellen, simultan als Stimulatoren und zur Apoptoseinduktion, war eine alloreaktive Aktivität der T-Zellen nicht mehr nachzuweisen. Stimulation und Apoptose mussten jedoch nicht notwendigerweise durch die gleichen Zellen vermittelt werden. Nach primärer allogener Stimulation mit EBV-B-Zellen war auch durch, mit den Stimulatorzellen HLA-identische, CD95L exprimierende Fibroblasten spezifisch Apoptose induziert worden. Die Depletion alloreaktiver T-Zellen war allerdings – wahrscheinlich erneut aufgrund der geringen CD95L Oberflächenexpression der Fibroblasten – weniger effektiv. Es konnte schließlich gezeigt werden, dass in einem sequentiellen Kultursystem, in dem Stimulatoren und apoptoseinduzierenden Zellen zudem HLA-different waren, eine in hohem Maß effektive Allodepletion möglich war. So wurde nach Stimulation mit EBV-B Zellen durch C1R- und C1R-A1-CD95L eine vollständige Depletion alloreaktiver T-Zellen erreicht. Es ließ sich weder eine residuale Proliferation noch eine Zytotoxizität der depletierten T-Zellen gegen die ursprünglichen Stimulatorzellen nachweisen. Im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung ist dieser letzte Ansatz besonders geeignet, da er bei jeder Spender / Empfänger-Konstellation zum Einsatz kommen kann.

Tab. 3.1. fasst die Ergebnisse der unterschiedlichen Kultursysteme zur Allodepletion nochmals zusammen.

Apoptose-induktoren	CD95L-Resistenz	CD95L Transduktion	m-CD95L	s-CD95L	spez. Cytotox. Jurkat E:T=2,5:1	Stimulatoren	Kultursystem	%spez. Apopt. CD4+	%spez. Apopt. CD8+	residuale allospez. Proliferation	max. allospez. Cytotox.
EBV-B-CD95L	nein	retroviral	nur mit enzym. Verstärker detektierbar	n.d.	30% (6h Assaydauer)	EBV-B-CD95L	simultan	54%	11%	67% (nur 1 Experiment)	n.d.
Fib-CD95L	ja, konstitutiv	lentiviral	10-15%	30ng/ml pro ca. 1000 Zellen (Fibrobl. sind 2-5x größer als C1R-Zellen)	85% (24h)	EBV-B-Zellen	sequentiell	43%	14%	21,7% (Stabw. 5,35 %)	7% (Stabw. 1,44%)
C1R-CD95L	ja	lentiviral	50-70% (Expression abnehmend)	23ng/ml pro ca. 2000 Zellen	90-95% (6h)	EBV-B-Zellen	sequentiell	32%	22%	n.d.	n.d.
C1R-A1-CD95L	ja	lentiviral	70-75%	16ng/ml pro ca. 2000 Zellen	90-95% (6h)	C1R-A1-CD95L	simultan	64%	50%	0,02% (Stabw. 0,03%)	3,3% (Stabw. 2,3%)
C1R-A1-CD95L	ja	lentiviral	70-75%	16ng/ml pro ca. 2000 Zellen	90-95% (6h)	EBV-B-Zellen	sequentiell	55%	21%	0,08% (Stabw. 0,102 %)	4,66% (Stabw. 3,0%)

**Tab. 3.1. Vergleich der unterschiedlichen Kultursysteme zur Allopeletion.**

-Die spez. Apoptose wurde nach Annexin V (AV) Färbung folgendermaßen berechnet:

% spez. Apo =  $\frac{[AV\ CD95L - AV\ GFP]/(100 - AV\ GFP)}{[100 - AV\ GFP]} \times 100$ . Repräsentative Werte aus jeweils 3 Experimenten (außer EBV-B-CD95L: 1 Experiment) sind aufgeführt.

-Die residuale allospezifische Proliferation wurde folgendermaßen berechnet:

$$\% \text{ residuale allospez. Proliferation} = \frac{\frac{\text{cpm allopep} - \text{cpm Mediumkontrolle}}{\text{cpm Maximalkontrolle} - \text{cpm Mediumkontrolle}}}{\frac{\text{cpm undepletiert} - \text{cpm Mediumkontrolle}}{\text{cpm Maximalkontrolle} - \text{cpm Mediumkontrolle}}} \times 100$$

-Die maximale Zytotoxizität nach Allopeletion wurde unabhängig von der E:T Ratio angegeben. Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils 3 Experimenten sind für Proliferation und Zytotoxizität aufgeführt.

### 3.4 Untersuchung von FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>) im Allodepletions Modell

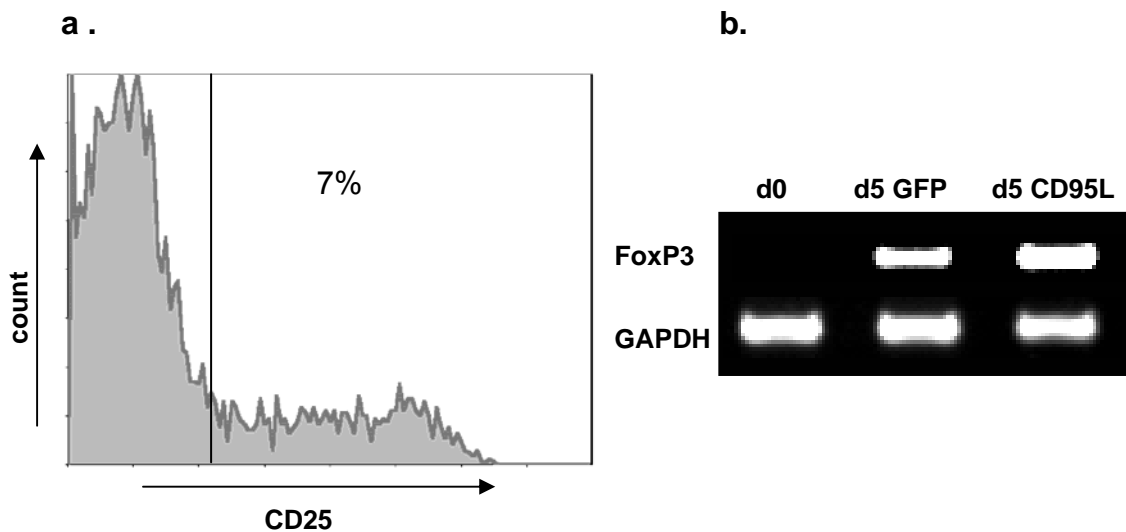
In murinen Modellen wurde gezeigt, dass FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>) in der Lage sind, GvHD abzuschwächen oder sogar zu verhindern (Hoffmann und Edinger 2006, Salomon *et al.*, 2006). Es war daher von großem Interesse, zu klären, ob diese Zellen in unseren Kultursystemen erhalten blieben oder ebenfalls eliminiert wurden.

FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen gehören zu den derzeit am Besten charakterisierten regulatorischen Zellen. Sie sind sowohl im Menschen als auch im Tiermodell beschrieben. T<sub>reg</sub> exprimieren außer CD25 ( $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors) und dem Transkriptionsfaktor FoxP3 eine Reihe anderer Moleküle, wie GITR (Glucocorticoid Induced TNFR family-related Receptor), CD62L, Neuropillin, CTLA4 (Cytolytic T-Lymphocyte Associated Antigen 4), OX40 (CD134) (Cobbold *et al.* 2003, Graca 2005, Baecher-Allan *et al.* 2006, Koenen und Joosten 2006). Keines dieser Oberflächenmoleküle ist jedoch spezifisch für T<sub>reg</sub>, so wird z.B. CD25 auch von aktivierten T-Zellen exprimiert. Der Transkriptionsfaktor FoxP3 ist für die Funktionalität von T<sub>reg</sub> essentiell: Mutationen des Genes führen zu einem schweren Immundefektsyndrom gekennzeichnet durch Immundysregulation und Autoimmunität (Fontenot und Rudensky 2005). Allerdings wird auch FoxP3 beim Menschen nicht ausschließlich von T<sub>reg</sub>, sondern auch nach Aktivierung von T-Zellen exprimiert (Gavin *et al.* 2006, Wang *et al.* 2007).

#### 3.4.1 Nachweis von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> und FoxP3<sup>+</sup> Zellen nach Kultur mit C1R-A1-CD95L

Bei der Kontrolle der Aktivierungsmarker auf T-Zellen nach simultaner Stimulation und Apoptoseinduktion durch C1R-A1-CD95L fiel ein unerwartet hoher Anteil (7%) nicht apoptotischer Zellen auf, die CD4 positiv waren und den Aktivierungsmarker CD25 exprimierten (Abb. 3.23.a.). Diese Beobachtung konnte nicht durch fehlende Depletion aktivierter, ebenfalls CD25 positiver T-Zellen erklärt werden, da keine Alloreaktivität mehr nachzuweisen war. Die Möglichkeit, dass es sich bei diesen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen um regulatorische T-Zellen handeln könnte, wurde durch die Untersuchung der FoxP3 Expression gestützt: während FoxP3 in frisch isolierten MNC (d0) nur marginal oder gar

nicht nachweisbar war, konnte FoxP3 nach Stimulation sowohl mit C1R-A1<sup>GFP</sup> als auch mit C1R-A1-CD95L durch RT-PCR in T-Zellen detektiert werden (Abb. 3.23.b.).



**Abb. 3.23. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (a) bzw. FoxP3<sup>+</sup> (b) Zellen bleiben nach simultaner Kultur mit C1R-A1-CD95L erhalten.** a. Nach 5 Tagen Stimulation mit C1R-A1-CD95L wurde die CD25 Expression auf CD4<sup>+</sup>, Annexin V negativen Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. b. Die FoxP3 Expression wurde mittels RT-PCR aus mRNA von 5000 viablen Zellen in MNC an d0 (linke Bande) und nach 5 Tagen Stimulation mit C1R-A1-GFP (mittlere Bande) bzw. C1R-A1-CD95L (rechte Bande) bestimmt. GAPDH Expression diente als Kontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives von 3 Experimenten.

Der Nachweis von FoxP3<sup>+</sup> Zellen nach simultaner Kultur ließ die Vermutung zu, dass T<sub>reg</sub> in diesem System erhalten blieben, also nicht sensibel gegen CD95L-vermittelte Apoptose zu sein schienen.

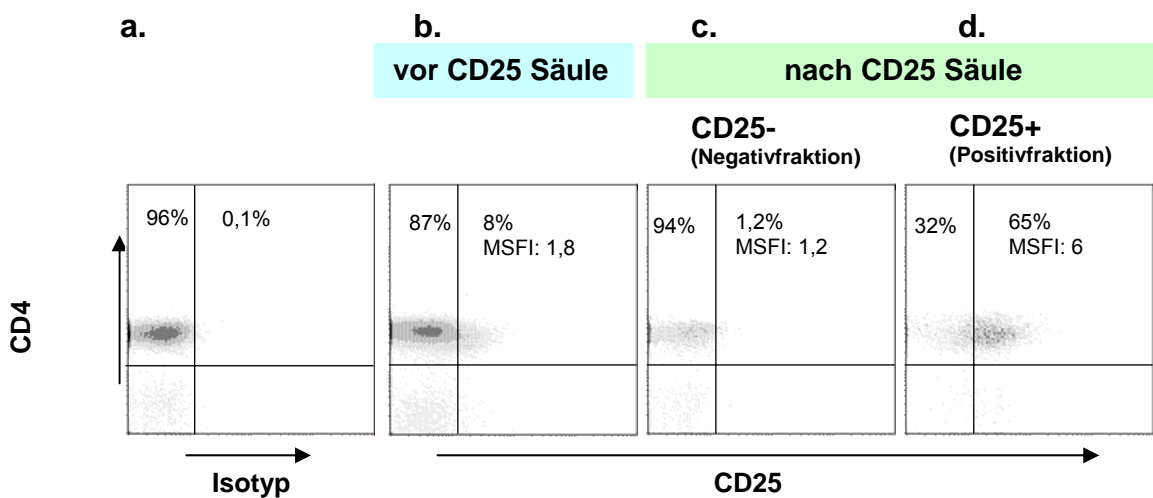
### 3.4.2 Untersuchung von T<sub>reg</sub> nach CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Selektion

Die FoxP3-Expression nach Kultur mit C1R-A1/ C1R-A1-CD95L war ein Hinweis auf die Präsenz regulatorischer T-Zellen. Zum einen ist ein sicherer Nachweis von T<sub>reg</sub> jedoch allein durch die FoxP3-RT-PCR nicht möglich, da FoxP3 auch von aktivierten humanen Zellen exprimiert wird. Zum anderen konnte aufgrund der RT-PCR Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden, dass FoxP3 auch von CD8<sup>+</sup> Zellen exprimiert wurde (Jarvis et al. 2005). Außerdem stellt die Analyse von T<sub>reg</sub> aufgrund des fehlenden linienspezifischen Markers nach Aktivierung (CD25<sup>+</sup> T-Zellen werden durch die Aktivierung CD25 positiv) eine besondere Herausforderung dar. Daher sollten T<sub>reg</sub> zur Untersuchung von Apoptosesensitivität, Erhalt und Funktion bereits vor der Kultur mit C1R-A1-CD95L durch CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Selektion angereichert und mit einer T<sub>reg</sub>-depletierten (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) Population verglichen werden.

### 3.4.2.1 Anreicherung und Depletion von T<sub>reg</sub>

Für die Isolierung von T<sub>reg</sub> folgten wir bisher publizierten Ansätzen und reicherten diese vor der Aktivierung durch CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Selektion an.

Aus Buffy-Coat - MNC wurden zunächst CD4<sup>+</sup> Zellen mit einer Reinheit von  $\geq 95\%$  selektioniert (Abb. 3.24 a-d). Im Gegensatz zu murinen CD25<sup>+</sup> Zellen (Liang *et al.*, 2005) lassen sich humane CD25<sup>+</sup> Zellen in peripheren MNC durchflusszytometrisch nicht als deutlich abgrenzbare Population darstellen, sondern sind vielmehr durch einen Fluoreszenzshift gekennzeichnet (Jonuleit *et al.* 2001, Ng *et al.* 2001, Jiang *et al.* 2003, Baecher-Allan *et al.* 2004, Suri-Payer *et al.*, 2005). Die prozentualen Angaben für CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen können daher nicht absolut, sondern nur als Annäherung gesehen werden. In unseren Experimenten exprimierten zwischen 5-10% der peripheren humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen CD25 (Abb. 3.24. b). Aus den CD4<sup>+</sup> selektionierten Zellen wurden durch magnetische Selektion CD25<sup>+</sup> T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ca. 65% Abb. 3.24.d.) von CD25<sup>-</sup> T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ca. 1,2% Abb. 3.24.c.) getrennt.



**Abb. 3.24. Anreicherung CD4<sup>+</sup> 25<sup>+</sup> Zellen.** CD4<sup>+</sup> Zellen wurden aus MNC mittels negativer Rosettierung (rosette-sep<sup>R</sup> CD4 Kit) mit einer Reinheit von 92-95% angereichert und mit PE-markiertem CD25 (Klon ACT-1) (b) gefärbt. Anschließend wurden CD25<sup>-</sup> (c) und CD25<sup>+</sup> (d) Zellen unter Verwendung von Anti-PE-Beads durch magnetische Selektion getrennt. Zur Kontrolle der Reinheit wurden die Zellen mit CD4 FITC und CD25 (Klon MA251) Cy5 gefärbt. Als Isotyp-Kontrolle wurde Maus-IgG1 verwendet (a). Der MSFI (Mean Shift in Fluorescence Intensity) wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{MSFI} = \frac{\text{mittlere Fluoreszenzintensität CD25 AK}}{\text{mittlere Fluoreszenzintensität Isotypkontrolle}}$$

### 3.4.2.2 Resistenz der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber CD95L vermittelter Apoptose

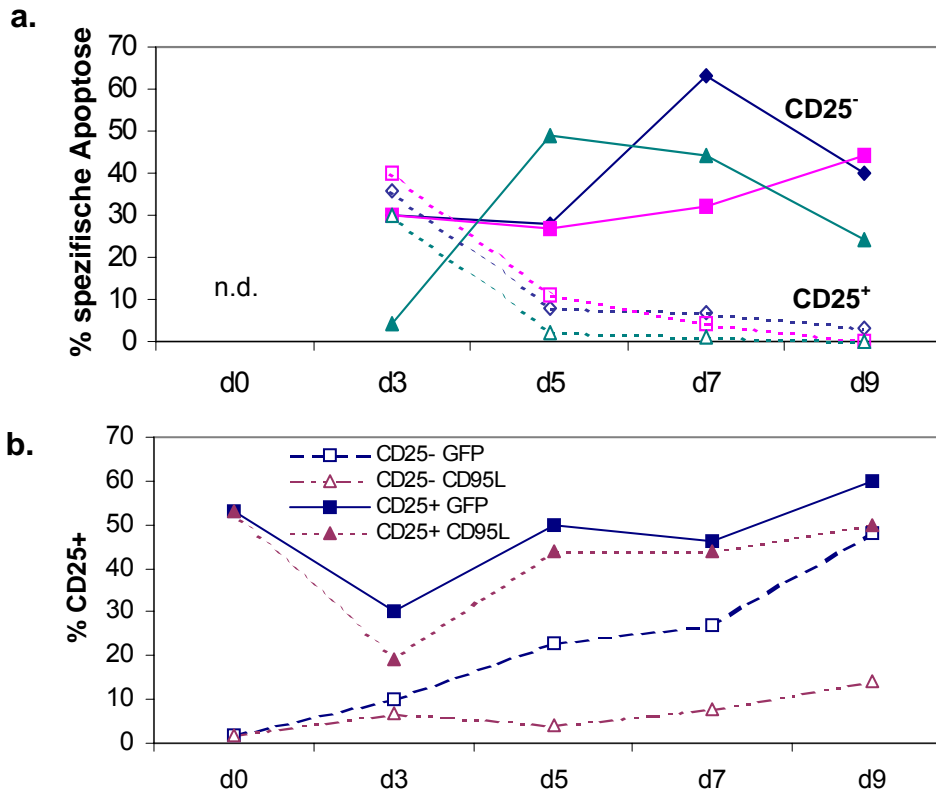
Um zu überprüfen, ob T<sub>reg</sub> tatsächlich resistent gegenüber CD95L vermittelter Apoptose sind, wurde die T<sub>reg</sub> angereicherte Population mit C1R-A1-CD95L bzw. C1R-A1<sup>GFP</sup> stimuliert. Nach 5 Tagen wurden viable Zellen isoliert und für 4 weitere Tage mit den gleichen Stimulatorzellen restimuliert, um über einen möglichst langen Zeitraum Apoptosesensitivität/-resistenz zu beobachten. Als Kontrolle dienten T<sub>reg</sub>-depletierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen, von denen bis zu 80% wie erwartet nach Aktivierung ebenfalls CD25 exprimierten. Der Anteil apoptotischer CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen wurde zu definierten Zeitpunkten durchflusszytometrisch nach AnnexinV Färbung bestimmt.

Da Lymphozyten 3-5 Tage nach Aktivierung ein apoptosesensitives Stadium erreichen (s. Abschnitt 3.1.1.), konnte in der CD25-depletierten Population nach 3-5 Tagen eine steigende Anzahl AnnexinV positiver CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen detektiert werden. Die spezifische Apoptose mit 30-60% blieb über die Kulturdauer hinweg erhalten (Abb. 3.25.a.).

Hingegen sank in der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> selektionierten Fraktion die Apoptoserate ab Tag 3 der Kultur auf Werte unter 10%, an Tag 9 unter 5% (Abb. 3.25.a.). Es kann daher gefolgert werden, dass T<sub>reg</sub>, zumindest bei längerem Kulturverlauf, resistent gegenüber CD95L vermittelter Apoptose sind. Die an Tag 3 noch vorhandene Apoptosesensitivität könnte auf *in vivo* voraktivierte, apoptosesensitive CD25<sup>+</sup> Zellen zurückzuführen sein, da frisch isolierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> eine Mischung voraktivierter T-Effektorzellen und T<sub>reg</sub> repräsentieren. Für eine Voraktivierung der Zellen sprach eine erhöhte CD95 Rezeptor Expression der angereicherten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (65% +/- 10%) im Vergleich zu CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Lymphozyten (23% +/- 1%) (nicht gezeigt).

Es konnte somit eine Resistenz der T<sub>reg</sub> angereicherten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Population gegenüber CD95L vermittelter Apoptose im simultanen Kultursystem mit C1R-A1-CD95L demonstriert werden, während wie zu erwarten T<sub>reg</sub>-depletierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellen nach 3 Tagen Stimulation sensitiv für CD95L vermittelte Apoptose wurden.

Diese Resultate korrelierten auch mit der gesamten CD25 Expression: diese blieb bei T<sub>reg</sub> angereicherten Zellen nach CD95L Exposition konstant zwischen 50-70%. Bei der T<sub>reg</sub> depletierten Population dagegen lag der Wert mit 5-10% deutlich unter den Werten der Kontrollkultur (20-36%) (Abb. 3.25.b.).



**Abb. 3.25 a. Apoptosesensitivität von CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellen.** CD25 depletierte (CD25<sup>-</sup>) bzw. CD25 angereicherte (CD25<sup>+</sup>) CD4<sup>+</sup> Zellen wurden mit C1R-A1<sup>GFP</sup> bzw. C1R-A1-CD95L stimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Anteil apoptotischer CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen nach Annexin V (AV) Gegenfärbung bestimmt. Die spezifische Apoptose errechnet sich aus:

$$\% \text{ spezifische Apoptose} = \frac{(\text{AV nach Stim. mit C1R-A1-CD95L}) - (\text{AV nach Stim. mit C1R-A1}^{\text{GFP}})}{(100 - \text{AV nach Stim. mit C1R-A1}^{\text{GFP}})} \times 100$$

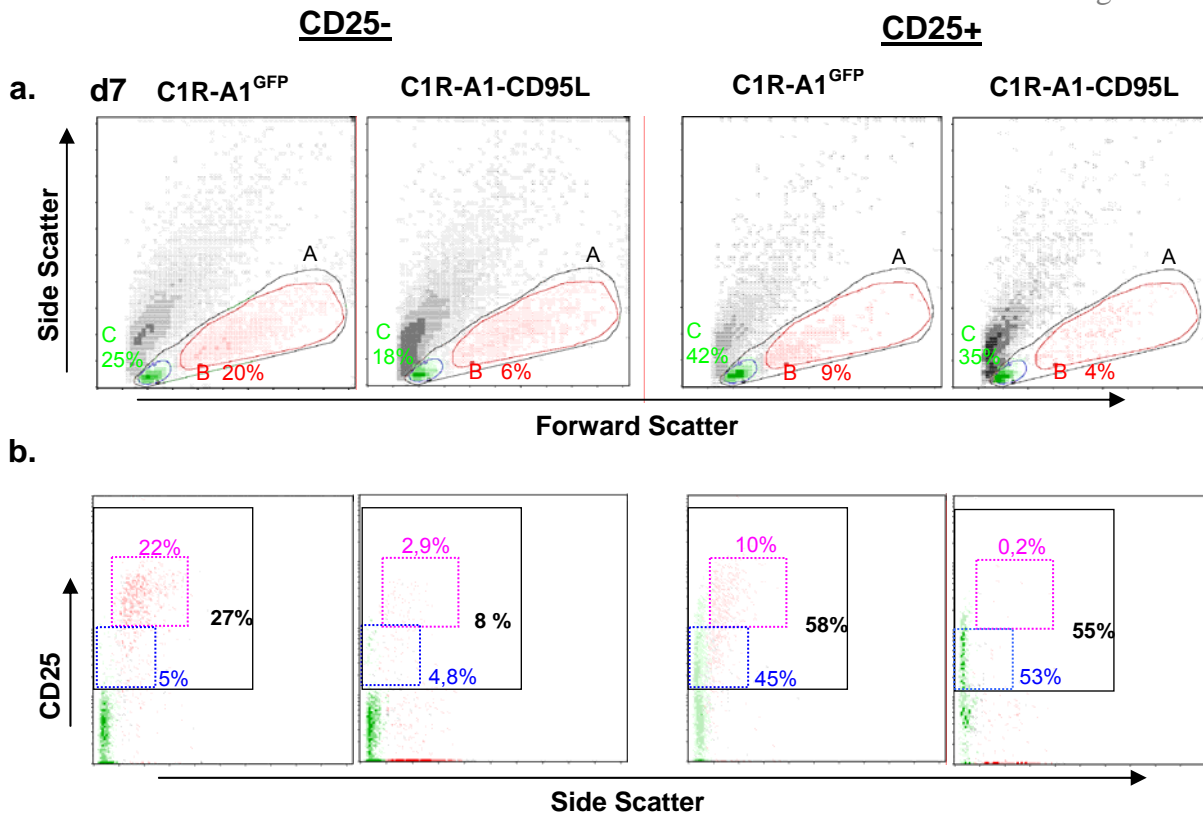
Gezeigt sind Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten. n.d.: not done

**b. CD25 Expression auf Annexin V neg. CD3<sup>+</sup> Zellen.** Die Expression von CD25 auf Annexin V negativen CD3<sup>+</sup> Zellen wurde an den angegebenen Tagen nach C1R-A1<sup>GFP</sup> bzw. C1R-A1-CD95L Stimulation durchflusszytometrisch bestimmt. Ein repräsentatives von 3 Experimenten ist gezeigt.

### 3.4.2.3 Dezimierung der CD25<sup>hi</sup> Population nach C1R-A1-CD95L Exposition

Bezüglich der Apoptosesensitivität konnte ein auffallender Unterschied zwischen der CD25 hoch exprimierenden (CD25<sup>hi</sup>) Population, und den CD25 mittel (intermediate, im) oder niedrig (low, lo) exprimierenden Zellen (CD25<sup>im/lo</sup>), beobachtet werden. Nach Kultur mit C1R-A1-CD95L wurde die CD25<sup>hi</sup> Population in allen Ansätzen dezimiert, während CD25<sup>im/lo</sup>- Zellen nicht betroffen waren (Abb. 3.26.b.). Diese Beobachtung war von Bedeutung, da regulatorische Funktionen bislang vor allem der CD25<sup>hi</sup>-Population zugeordnet worden waren (Baecher-Allen *et al.* 2001,2004; Roncador *et al.* 2005, Fritsching *et al.* 2005). Nach durchflusszytometrischen Kriterien (große und granulierte Zellen, Forward- und Side-scatter high) war die CD25<sup>hi</sup>-Population in unserem System allerdings aktivierten Zellen zuzuordnen (Abb. 3.26.a).





**Abb. 3.26. Dezimierung der CD25 hoch exprimierenden (CD25<sup>hi</sup>) Population durch C1R-A1-CD95L.** An d7 der Kultur mit C1R-A1<sup>GFP</sup> bzw. C1R-A1-CD95L wurde die CD25 Expression der CD4<sup>+</sup> Zellen im Lebendgate bestimmt.

**a.** Das Lebendgate A (schwarz) wurde in Forward/Side-Scatter (FSC/SSC) high (gate B, rot), entsprechend der aktivierten Zellpopulation und FSC/SSC low (gate C, grün) aufgeteilt.

**b.** Die farbliche Kennzeichnung dieser gates wurde bei den CD25 Färbungen beibehalten. Die Prozentzahlen der gesamten CD25 Expression (schwarz) und der CD25<sup>hi</sup> (pink) und CD25<sup>im/lo</sup> (blau) exprimierenden Zellen sind jeweils angegeben.

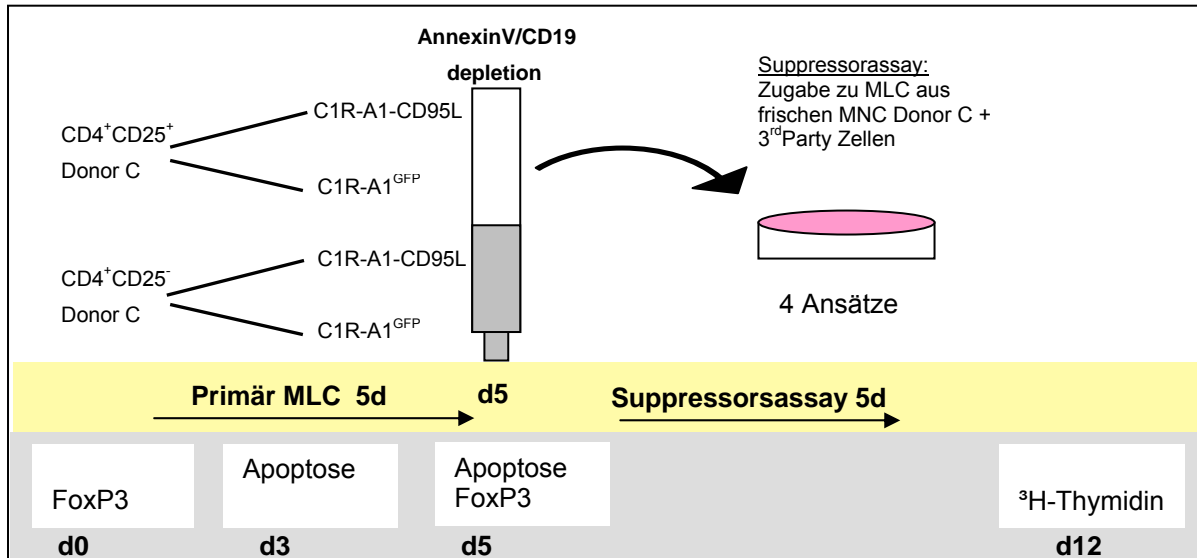
Ein repräsentatives von 3 Experimenten ist gezeigt.

Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass aktivierte, CD25<sup>hi</sup> T-Zellen sowohl in CD25- als auch in CD25+ selektionierten Populationen nach CD95L Exposition apoptotisch wurden, während CD25<sup>im/lo</sup> -T-Zellen resistent gegen CD95L vermittelte Apoptose waren und vorallem in der T<sub>reg</sub> angereicherten Fraktion nachzuweisen waren.

#### 3.4.2.4 Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen nach Kultur mit CD95L exprimierenden Stimulatorzellen.

Nachdem eine Apoptoseresistenz der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>im/lo</sup> T-Zellen gezeigt worden war, sollte untersucht werden, ob es sich bei diesen Zellen tatsächlich phänotypisch und funktional um regulatorische T-Zellen handelte. Die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> selektionierten Zellen wurden mit C1R-A1-CD95L bzw. C1R-A1<sup>GFP</sup> kokultiviert und zu definierten Zeitpunkten während der Kultur Apoptose und FoxP3 Expression untersucht. Als funktioneller Nachweis wurde zudem ein Suppressorassay durchgeführt: die Zellen wurden nach 5 Tagen Kultur einer

frisch angesetzten MLC aus kryokonservierten MNC des gleichen Spenders und 3<sup>rd</sup>-party Zellen als Stimulatorzellen zugesetzt. Als Kontrolle wurden die gleichen Versuche mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellen als Ausgangspopulation durchgeführt. Einen Überblick über den Versuchsaufbau gibt Abb. 3.27.

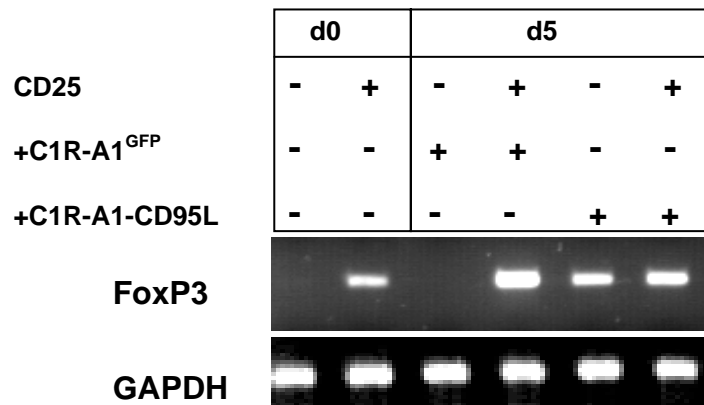


**Abb. 3.27. Schematische Übersicht des Versuchsaufbaus:** CD4<sup>+</sup> Zellen wurden durch magnetische Selektion in CD25<sup>+</sup> und CD25<sup>-</sup> Fraktionen aufgetrennt, über 5 Tage mit C1R-A1-CD95L und C1R-A1-GFP aktiviert. Die kultivierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> bzw. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellen wurden anschließend im Suppressorassay zu einer MLC aus kryokonservierten MNC des gleichen Spenders + 3<sup>rd</sup> party Zellen gegeben. Zu den angegebenen Zeitpunkten erfolgten Apoptose-, GTR und FoxP3 Detektion.

#### 3.4.2.4.1 FoxP3 Expression in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> bzw CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> -selektionierten T-Zellen

Der Transkriptionsfaktor FoxP3 war in murinen Zellen ausschließlich in Assoziation mit T<sub>reg</sub> beschrieben (Fontenot et al. 2003, 2005, Gavin et al. 2007, Williams und Rudensky 2007). Für humane Zellen wurde auch eine Expression von FoxP3 auf aktivierten, nicht regulatorischen T-Zellen gezeigt (Gavin et al. 2006, Wang et al. 2007). Da jedoch auch keine anderen linienspezifischen Marker definiert waren, untersuchten wir mittels RT-PCR die Genexpression von FoxP3 in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> bzw. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> selektionierten Zellen nach Stimulation mit C1R-A1-CD95L und C1R-A1<sup>GFP</sup> (s. Schema Abb. 3.27.). Wie Abb. 3.28. zeigt, konnte FoxP3-m-RNA in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen zu jedem Zeitpunkt der Kultur, sowohl mit C1R-A1<sup>GFP</sup> als auch mit C1R-A1-CD95L nachgewiesen werden. Mit dieser Analyse wurde bestätigt, dass FoxP3 positive Zellen nach Kultur mit C1R-A1-CD95L erhalten blieben.

In CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> selektionierten Zellen war an d0 wie erwartet kein FoxP3 nachweisbar. Erstaunlicherweise konnte nach 5 Tagen eine FoxP3-Expression detektiert werden - jedoch allein nach C1R-A1-CD95L Stimulation. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen hingegen, die mit C1R-A1<sup>GFP</sup> stimuliert worden waren, exprimierten kein FoxP3 an d5 (Abb. 3.28.).



**Abb. 3.28. FoxP3 Expression von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> bzw CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> isolierten Zellen nach Stimulation mit C1R-A1-GFP bzw C1R-A1-CD95L.** An d0 und d5 der Stimulation wurde mRNA aus jeweils 5000 viablen Zellen gewonnen. Der Nachweis von FoxP3 mRNA erfolgte mittels RT-PCR. Zur Kontrolle diente der Nachweis von GAPDH. Gezeigt ist eines von 2 unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend wurde FoxP3 von T<sub>reg</sub>-angereicherten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen sowohl nach C1R-A1<sup>GFP</sup> als auch nach C1R-A1-CD95L Stimulation exprimiert. Dieses Ergebnis bestätigt den Erhalt von T<sub>reg</sub> durch Resistenz gegen CD95L vermittelte Apoptose. Darüberhinaus konnte hier sogar eine Anreicherung von T<sub>reg</sub> durch CD95L Exposition festgestellt werden: T<sub>reg</sub>-depletierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellen exprimierten FoxP3 überraschend nach C1R-A1-CD95L Exposition, während nach C1R-A1<sup>GFP</sup>-Kultur kein FoxP3 detektierbar war.

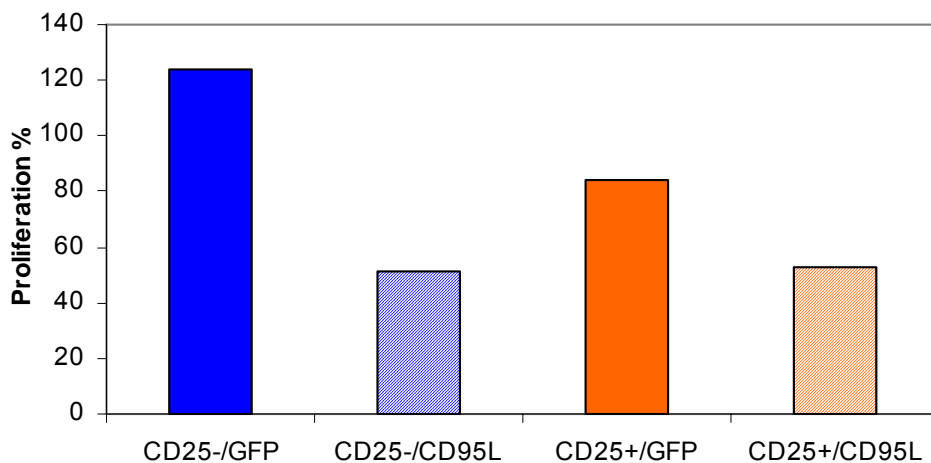
#### **3.4.2.4.2 Suppressorische Kapazität von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen**

In einem Suppressorsassay wurden kultivierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> bzw. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen (Donor C) für die Untersuchung ihrer Funktionalität einer Primär-MLC zugesetzt, in welcher kryokonservierte MNC (ebenfalls Donor C) mit bestrahlten 3<sup>rd</sup>-party Zellen stimuliert wurden (s. Schema Abb. 3.27.).

Tatsächlich führte die Zugabe von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen nach Kultur mit C1R-A1-CD95L in einer Konzentration von 1:1 zu einer Suppression der Proliferation um ca. 50% (Abb. 3.29.). Als Kontrolle wurden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen nach

Kultur mit C1R-A1<sup>GFP</sup> zugegeben, was nur zu einer Suppression um 20% - 30% führte (Abb. 3.29.).

Auch für T<sub>reg</sub>-„depletierte“ CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen konnte nach Kultur mit C1R-A1-CD95L suppressorische Kapazität nachgewiesen werden. Diese supprimierten die Proliferation in der MLC um 50% und waren damit in ihrer Wirkung vergleichbar mit der T<sub>reg</sub>-angereicherten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Population nach C1R-A1-CD95L Stimulation (Abb. 3.29.). C1R-A1<sup>GFP</sup>-stimulierte T-Zellen der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Fraktion wiesen dagegen keine supprimierenden Eigenschaften auf (Abb. 3.29.). Somit korrelierten diese Resultate mit der nachgewiesenen FoxP3 Expression (Abb. 3.28.).



**Abb. 3.29. Suppressorische Kapazität der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> bzw CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> selektionierten Zellen nach Kultur mit C1R-A1-GFP bzw C1R-A1-CD95L.** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (rot) bzw CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (blau) T-Zellen wurden für 5 Tage mit C1R-A1-GFP (gefüllte Balken) bzw C1R-A1-CD95L (schraffierte Balken) stimuliert. Viable T-Zellen („suppressor“) wurden für die Bestimmung der suppressorischen Kapazität in einer Konzentration von 1:1 (suppressor/responder) einer MLC aus 3rd-party Zellen und kryokonservierter MNC (responder) zugefügt (s. Abb.3.27).

Die Proliferation wurde mittels <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbaus 5 Tage später bestimmt. Als Kontrollen wurden sowohl kryokonservierte MNC mit 3<sup>rd</sup>-party Zellen ohne Zusatz kultivierter T-Zellen („nicht inhibierte“ MLC) und als auch kultivierte T-Zellen mit 3<sup>rd</sup>-party Zellen („Kontrolle“) stimuliert. Die Suppression wurde als prozentuale Proliferation der „nicht inhibierten“ MLC berechnet, nachdem die Proliferation der kultivierten T-Zellen mit 3<sup>rd</sup>-party Zellen abgezogen wurde. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der nicht inhibierten Proliferation nach Abzug der Kontroll-Proliferation von einem dreier unabhängiger Experimente:

$$\text{Proliferation \%} = \frac{(\text{cpm Suppressorassay}) - (\text{cpm "Kontrolle"})}{(\text{cpm nicht inhibierte MLC})} \times 100$$

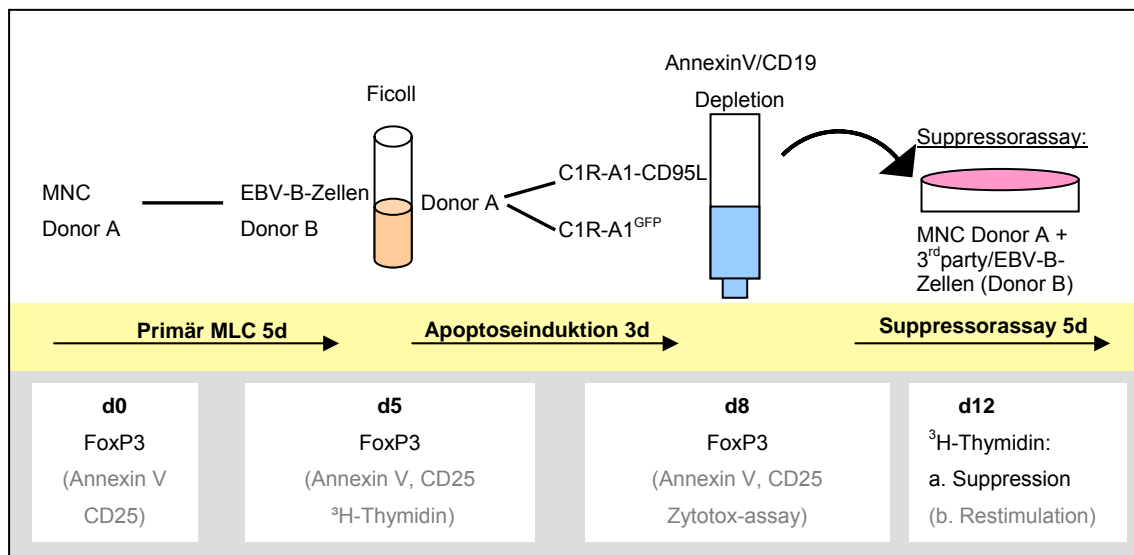
Zusammenfassend konnte in Korrelation mit der FoxP3 Expression die suppressorische Wirkung der T<sub>reg</sub>-angereicherten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen und auch der T<sub>reg</sub>-„depletierten“ CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellen nach CD95L Exposition demonstriert werden. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellen, die mit C1R-A1<sup>GFP</sup> kultiviert wurden, zeigten keine suppressorische Wirkung. Diese Befunde bestätigten, dass T<sub>reg</sub> nach C1R-A1-CD95L Exposition angereichert wurden.

### 3.4.3 Erhalt regulatorischer T-Zellen im sequentiellen Kultursystem

Zusammenfassend zeigten die bisherigen Ergebnisse, dass FoxP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> nach Kultur mit CD95L exprimierenden C1R-A1-Zellen erhalten blieben.

Auch im sequentiellen Kultursystem (Abschnitt 3.3.4.) sollte untersucht werden, ob FoxP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> Zellen erhalten blieben. Bei den Experimenten wurde auf die Selektion CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+/-</sup> Zellen verzichtet und, wie für die Depletion alloreaktiver T-Zellen, mit CD56<sup>-</sup> MNC gearbeitet, um einen möglichen Einfluss von NK-Zellen auszuschließen.

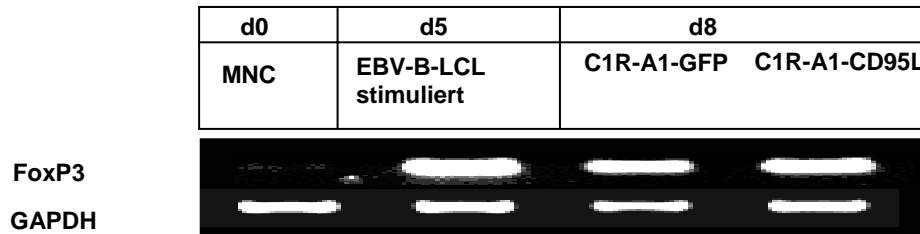
CD56 depletierte MNC wurden mit EBV-B-Zellen (HLA-different zu C1R-A1) über 5 Tage stimuliert. Nach Anreicherung der viablen Zellen erfolgte die Apoptoseinduktion durch Inkubation mit C1R-A1-CD95L für drei Tage. Während des Kulturverlaufes untersuchten wir die Expression von FoxP3 und testeten die inhibitorische Kapazität der Zellen in einem Suppressorassay. Routinemäßig wurden ebenso Apoptose, CD25 Expression und die Effektivität der Depletion alloreaktiver T-Zellen in einem Zytotox- und Proliferationsassay kontrolliert, um auszuschließen, dass eine unzureichende Depletion mit dem Erhalt von T<sub>reg</sub> einhergehen würde (nicht gezeigt, Ergebnisse entsprechend Abschnitt 3.3.4.1. und 3.3.4.2.). Abb. 3.30. gibt einen schematischen Überblick über das Experiment.



**Abb. 3.30. Schematische Übersicht des Versuchsaufbaus.** CD56 depletierte MNC (Donor A) wurden mit EBV-B-Zellen (Donor B) stimuliert und nachfolgend zur Apoptoseinduktion mit C1R-A1-CD95L (Kontrolle C1R-A1<sup>GFP</sup>) inkubiert. Die so kultivierten, viablen Zellen wurden für einen Suppressorassay zu einer MLC aus kryokonservierten MNC (Donor A) und EBV-B-Zellen (Donor B) bzw. 3<sup>rd</sup>-party-Zellen gegeben. An den angegebenen Tagen wurde FoxP3 und Suppression untersucht. Die in Klammern stehenden Analysen wurden routinemäßig mitgeführt, ohne dass deren Ergebnisse hier nochmals aufgeführt werden, da sie Abschnitt 3.3.4. entsprechen.

### 3.4.3.1 FoxP3 Expression im sequentiellen Kultursystem

Die FoxP3 Genexpression wurde mittels RT-PCR an Tag 0, 5 und 8 der Kultur bestimmt. Vor Stimulation war FoxP3 nur geringfügig nachweisbar, während an d5 nach EBV-B-Zell-Stimulation FoxP3 exprimiert wurde. Nach Kultur mit C1R-A1-CD95L und C1R-A1<sup>GFP</sup> über 3 Tage blieb die FoxP3 Gen-Expression erhalten (Abb. 3.31.).



**Abb. 3.31. FoxP3 mRNA Expression im sequentiellen Kultursystem.** RNA aus jeweils 5000 viablen Zellen wurde an d0, d5 (nach EBV-B Stimulation) und d8 (nach C1R-A1-CD95L und C1R-A1-GFP Inkubation) isoliert und die FoxP3 Expression mittels RT-PCR untersucht. Zur Kontrolle wurde GAPDH bestimmt. Eines von zwei Experimenten ist gezeigt.

Auch im sequentiellen Kultursystem blieben somit nach CD95L Exposition FoxP3<sup>+</sup> Zellen erhalten. Der Nachweis einer FoxP3 Gen-Expression an d5 nach EBV-B-Zell- Stimulation kann entweder durch eine Anreicherung oder durch Neusynthese des Moleküls nach Aktivierung erklärt werden.

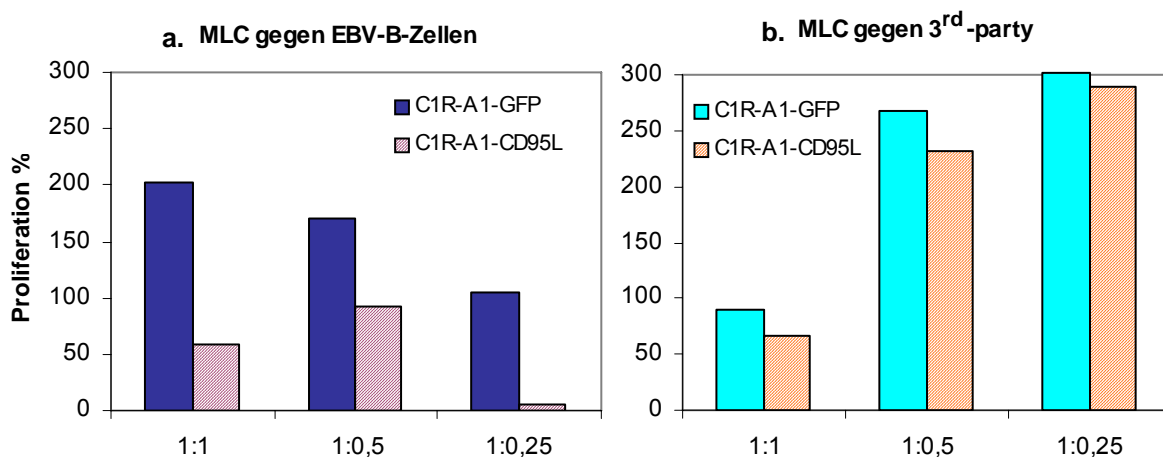
### 3.4.3.2 Suppressorische Kapazität von MNC im sequentiellen Kultursystem

Zusätzlich zum Nachweis von FoxP3 nach C1R-A1-CD95L Kultur im sequentiellen System sollte ebenfalls der funktionelle Aspekt von regulatorischen Zellen in diesem System geklärt werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob eine mögliche suppressorische Wirkung antigenspezifisch, d.h. spezifisch für die zur Primärstimulation eingesetzten EBV-B-Zellen wäre. Daher wurden die mit C1R-A1-CD95L kultivierten Zellen (> 95% T-Zellen, Donor A) in Suppressorassays zu einer MLC kryokonservierter MNC (Donor A) gegen die initialen EBV-B-Zellen (Donor B) und außerdem zu einer MLC gegen 3<sup>rd</sup>-party Zellen (neue Antigene) gegeben (s. Schema Abb. 3.30.). Antigenspezifisch konnte bei der Zugabe von 1:1 kultivierter Zellen/MNC eine Suppression der Proliferation von ca. 50% erreicht werden, wenn die initialen EBV-B-Zellen als Stimulatoren im Suppressorassay verwendet wurden (Abb. 3.32.a.). Für die Untersuchung antigenunabhängiger Suppression wurden 3<sup>rd</sup>-party Zellen im Assay verwendet. Hier konnte nur eine Suppression von 20-

30% in der Verdünnung 1:1 erreicht werden, bei höheren Verdünnungsstufen gab es keine suppressierenden Effekte mehr (Abb. 3.32.b.).

Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse auf eine Alloantigenspezifität der erhaltenen T<sub>reg</sub> hin.

In den Kontrollexperimenten, in denen C1R-A1<sup>GFP</sup>-inkubierte Zellen zum Suppressorassay hinzugefügt wurden, konnte keine Suppression gefunden werden (Abb. 3.32). Die suppressierende Funktion dieser Zellen korrelierte also überraschenderweise nicht mit der FoxP3 Expression: obwohl FoxP3 nach der Inkubation mit C1R-A1<sup>GFP</sup> exprimiert wurde (Abb. 3.31.), war keine Suppression nachweisbar.



**Abb. 3.32. Supprimierende Wirkung von EBV-B-Zell stimulierten MNC nach CD95L bzw. GFP Exposition.** Viable T-Zellen wurden nach sequentieller Kultur mit EBV-B-Zellen und C1R-A1-CD95L bzw. -GFP in den angegebenen Konzentrationen (MNC:kultivierten T-Zellen) zu einer MLC aus kryokonservierten MNC des gleichen Spenders und **a.** den primären EBV-B-Stimulatoren oder **b.** 3<sup>rd</sup>-party Zellen gegeben und für 5 Tage kokultiviert. Als Kontrollen dienten 1. kryokonservierte MNC, die ohne Zusatz von kultivierten T-Zellen mit EBV-B-Zellen bzw. 3<sup>rd</sup>-party Zellen stimuliert wurden (nicht inhibierte MLC) und 2. kultivierte T-Zellen, die mit den Stimulatorzellen alleine inkubiert wurden ("Kontrolle"). Die Proliferation wurde nach Bestimmung des <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbaus folgendermaßen berechnet:

$$\text{Proliferation \%} = \frac{\text{cpm Suppressorassay} - \text{cpm Kontrolle}}{\text{cpm "nicht inhibierte" MLC}} \times 100$$

Die funktionelle Analyse zeigt, dass T<sub>reg</sub> auch im sequentiellen Kultursystem erhalten blieben. Eine suppressorische Wirkung wurde nur nach CD95L Exposition gefunden, und nicht nach Inkubation mit C1R-A1<sup>GFP</sup>. Dieses Ergebnis steht in Diskrepanz zur FoxP3-Expression, die auch nach C1R-A1<sup>GFP</sup> Kultur gefunden wurde. Folglich demonstrieren diese Experimente, dass die Expression von FoxP3 alleine nicht ausreicht, um den definitiven Nachweis für funktionelle T<sub>reg</sub> zu führen. Die höhere suppressorische Wirkung gegenüber den primären Stimulatoren im Vergleich zu Zellen, die neue Antigene präsentieren, lässt eine Alloantigenspezifität dieser Zellen vermuten.

#### 3.4.4 Zusammenfassung: Untersuchung von FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>) nach Kultur mit C1R-A1-CD95L

Es konnte gezeigt werden, dass funktionelle FoxP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> nach Kultivierung mit CD95L exprimierenden Stimulatorzellen erhalten blieben und darüberhinaus sogar angereichert wurden.

In Experimenten, in denen T<sub>reg</sub> durch CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Selektion angereichert und mit T<sub>reg</sub>-„depletierten“ Zellen verglichen wurden, konnte für die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>im/lo</sup> Population eine Resistenz für CD95L vermittelte Apoptose gezeigt werden, während CD25<sup>hi</sup> exprimierende Zellen in allen Ansätzen durch Kultivierung mit C1R-A1-CD95L eliminiert wurden. FoxP3 und suppressorische Aktivität war in der T<sub>reg</sub>-angereicherten Population vor und nach Kultur sowohl mit C1R-A1-CD95L als auch mit C1R-A1<sup>GFP</sup> nachweisbar. Überraschenderweise wurde FoxP3 auch von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> selektionierten Zellen (der T<sub>reg</sub>-depletierten Population) nach 5 Tagen Kultur mit C1R-A1-CD95L exprimiert, während nach C1R-A1<sup>GFP</sup> Stimulation kein Nachweis des Transkriptionsfaktors möglich war. Die FoxP3 Expression korrelierte mit der Funktionalität der untersuchten Zellen: Tatsächlich supprimierten auch T<sub>reg</sub>-„depletierte“, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> selektionierte Zellen nach C1R-A1-CD95L-Kultur die Proliferation aktivierter MNC, während nach C1R-A1<sup>GFP</sup>-Kultur keine suppressorische Wirkung zu finden war.

Auch im sequentiellen Kultursystem zur Depletion alloreaktiver Zellen blieben FoxP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> erhalten. FoxP3 wurde in unstimulierten MNC nicht, oder nur marginal nachgewiesen, während die FoxP3 Genexpression nach Aktivierung mit EBV-B-Zellen gezeigt werden konnte. Diese blieb sowohl nach C1R-A1<sup>GFP</sup>- als auch nach C1R-A1-CD95L Inkubation erhalten.

Dennoch konnte, trotz positivem FoxP3 Nachweis, keine suppressorische Kapazität nach C1R-A1<sup>GFP</sup> Inkubation gefunden werden, so dass FoxP3 Expression also nicht obligatorisch mit Funktionalität von T<sub>reg</sub> korrelierte.

Nach Inkubation mit C1R-A1-CD95L hingegen wurde suppressorische Aktivität nachgewiesen. Wenn die initialen EBV-B-Zellen für die MLC im Suppressorassay verwendet wurden, war hierbei der Suppressionseffekt deutlich höher, als im Ansatz mit 3<sup>rd</sup>-party-Zellen, die ein Gemisch neuer Antigene präsentierten. Daher weist die suppressorische Kapazität der nach CD95L Exposition erhaltenen T<sub>reg</sub> auf Antigenspezifität hin.



## 4 DISKUSSION

Das therapeutische Potential des adoptiven Immuntransfers von T-Zell-Präparaten zur Behandlung von Immundefizienz nach haploidenter Stammzelltransplantation ist durch alloreaktive T-Zellen limitiert. Um GvHD zu vermeiden, müssen solche Zellen vor der Verabreichung von Donorlymphozyten eliminiert oder zumindest reduziert werden. Trotz intensiver Forschung und unterschiedlichster Ansätze zur Depletion alloreaktiver Zellen, gibt es bislang keine Methode, welche das GvHD-Risiko befriedigend reduzieren konnte.

CD95L vermittelte Apoptose ist für die Homöostase des Immunsystems von entscheidender Bedeutung: sie stellt einen der Hauptmechanismen für die Kontrolle von T-Zell Antworten dar und ist insbesondere für die Toleranz gegen Selbst-Antigene und damit Prävention von Autoimmunerkrankungen, sowie für die Beendigung von Immunantworten durch aktivierungs-induzierten Zelltod (*activation-induced cell death*, AICD) von Bedeutung (Dhein *et al.* 1995; Süss und Shortman 1996; Krueger *et al.* 2003, Askenasy *et al.* 2005).

Für die vorliegende Arbeit boten die immunregulatorischen Funktionen von CD95L eine attraktive Grundlage zur gezielten Apoptoseinduktion in allogen-aktivierten Zellen.

Die Bedeutung regulatorischer CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen (T<sub>reg</sub>) für die Inhibition von GvHD und die Induktion von Toleranz nach Transplantation wurde mehrfach gezeigt (Cohen *et al.* 2002, Taylor *et al.* 2002, Hoffmann *et al.*, 2002, Edinger *et al.* 2003, Trenado *et al.* 2003, 2004, Hoffmann und Edinger 2006, Salomon *et al.* 2006, Bénard *et al.* 2006, Olkinuora *et al.* 2007).

So war die Präservierung von T<sub>reg</sub> bei effektiver Depletion alloreaktiver T-Zellen für die adoptive Immuntherapie nach HLA-haploidenter Stammzelltransplantation ein wünschenswertes Ziel.

In dieser Arbeit wurde das CD95/CD95L System genutzt, alloreaktive T-Zellen mittels CD95L exprimierender Zellen zu depletieren. Dazu wurden unterschiedliche B-Zell-Linien und Fibroblasten mit CD95L transduziert und verschiedene Stimulations-/Apoptoseinduktionssysteme untersucht, um die

Effektivität der Allodepletion zu optimieren, mit dem Ziel, sich einer klinischen Anwendbarkeit zu nähern.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$   $T_{reg}$  nach CD95L vermittelter Apoptose und Allodepletion. Die Apoptosesensitivität von  $T_{reg}$  wurde analysiert und eine phänotypische und funktionelle Charakterisierung dieser Zellen in unterschiedlichen CD95L-Allodepletionssystemen durchgeführt.

#### 4.1 Vorarbeiten zur Apoptosesensitivität von T-Zellen

CD95L wird physiologisch auf aktivierten T-Zellen exprimiert und ist zum einen verantwortlich für die Zerstörung CD95 Rezeptor positiver Zielzellen und zum anderen für die Terminierung einer Immunantwort durch Induktion von para- oder autokrin vermittelter Apoptose (Suda *et al.* 1993, Dhein *et al.* 1995, Alderson *et al.* 1995, Krueger *et al.* 2003 ).

Die in der Dissertation vorgestellte Methode zur effektiven Depletion alloreaktiver T-Zellen beruhte auf der Tatsache, dass stimulierte T-Zellen nach ca. 6 Tagen sensitiv für CD95L vermittelte Apoptose werden, während naive T-Zellen resistent gegenüber diesem Apoptoseweg sind (Klas *et al.* 1993, O'Flaherty *et al.* 1998). Weitere Arbeiten dieser und anderer Gruppen zeigten, dass jedoch Costimulation via CD28 die Apoptosesensitivität aktivierter T-Zellen einschränkt (McLeod *et al.* 1998, Kirchhoff *et al.* 2000). Wurde die Costimulation mit dem CD28 Liganden CTLA4-Ig blockiert, war die Apoptosesensitivität deutlich höher (Lu *et al.* 1997, Li *et al.* 1999). Die Costimulation führte zur Hochregulation der anti-apoptotischen Moleküle Bcl- $\chi_L$  und FLIPs, zu einer verminderten DISC-Formation und der Inhibition der CD95L-Induktion in aktivierten T-Zellen (Kirchhoff *et al.* 2000, Krüger *et al.* 2003).

Daher war es für unsere Arbeit von essentieller Wichtigkeit, zu überprüfen, ob und wann aktivierte T-Zellen Apoptosesensitivität erreichten und durch CD95 vermittelte Apoptose eliminiert werden konnten. Wir prüften die Sensitivität für CD95 Antikörper vermittelte Apoptose in verschiedenen Stimulationssystemen. In OKT3/CD28, PHA oder allogenen stimulierten Zellen konnte ab Tag 3-5 eine zunehmende Sensitivität für anti-CD95 vermittelte Apoptose nachgewiesen werden, die ab ca. d7 ein Plateau erreichte. Eine Resistenz war auch nach längerer Stimulationsdauer (nicht gezeigt) nicht nachweisbar.

Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den o.g. Arbeiten, in denen ebenfalls anti-CD95 zur Apoptoseinduktion aktivierter Zellen verwendet wurde (Lu *et al.* 1997, McLeod *et al.* 1998). Die Arbeit von Lu und Mitarbeitern wurde mit murinen 48h-ConA-Blasten durchgeführt, die mit CD95L exprimierenden dendritischen Zellen für 4h kokultiviert wurden. Unserer Erfahrung nach war in dieser Studie sowohl die Stimulationsdauer als auch die Dauer der CD95L Exposition zu kurz, um effektiv Apoptose zu induzieren. McLeod und Mitarbeiter stimulierten T-Zellen für 3 Tage mit OKT3/CD28 und induzierten anschließend mit 0,3µg/ml anti-CD95 für 18h Apoptose. Wir fanden eine effektive Apoptoseinduktion erst ab einer Konzentration von 1µg/ml anti-CD95 und setzten für maximale Effektivität die doppelte Menge für unsere Experimente ein.

Da wir eine hochgradige Apoptoseinduktion in unseren Stimulationssystemen erreichten, muss davon ausgegangen werden, dass die Protektion vor CD95 vermittelter Apoptose durch Costimulation nur eingeschränkt gegeben ist. Nach ausreichend langer Dauer der Stimulation und Apoptoseinduktion und einer ausreichenden Menge an anti-CD95 konnten wir keine Apoptoseresistenz nachweisen.

Somit war die Voraussetzung für eine effektive CD95L vermittelte Depletion alloreaktiver T-Zellen gegeben.

## **4.2 Generierung CD95L exprimierender Zellen zur Stimulation und/oder Apoptoseinduktion**

Für die Generierung CD95L exprimierender Zellen wurden in erster Linie B-Zell-Linien gewählt, die alle Voraussetzungen antigen-präsentierender Zellen (APC) aufwiesen, da sie simultan zur Stimulation und Apoptoseinduktion verwendet werden sollten. Für eine weitere Strategie, in der Stimulation und Apoptose sequentiell durch unterschiedliche Zellen induziert wurde, wurden neben B-Zell-Linien auch CD95L exprimierende Fibroblasten generiert.

### **4.2.1 Retrovirale CD95L Transduktion von EBV-B-Zellen**

EBV-B-Zellen sind exzellente antigen-präsentierende Zellen (APC) und exprimieren alle benötigten stimulatorischen Moleküle, wie MHC Klasse-I und -II und eine weite Bandbreite von Costimulatoren, wie CD40, CD80 und CD86

(Dunnion *et al.* 1999; Amrolia *et al.* 2003). Für die Stimulation von T-Zellen und Apoptoseinduktion durch gleichzeitige CD95L Expression wurden deshalb EBV-B-Zellen zur Transfektion mit CD95L c-DNA verwendet.

Da am DKFZ in Heidelberg (Ingrid Herr) ein retrovirales Vektorsystem für CD95L zur Verfügung stand, wurden dort im Rahmen eines Kooperationsprojektes, von uns EBV-transformierte B-Zellen (HLA-typisiert), mit Wildtyp CD95L-DNA transduziert. Auf den CD95L transduzierten EBV-B-Zellen (EBV-B-CD95L) konnte nur eine geringe Oberflächenexpression des Liganden nachgewiesen werden, obwohl die durch den Vektor vermittelte Puromycinresistenz der transduzierten Zellen für eine erfolgreiche Transduktion sprach. Die naheliegendste Erklärung für die geringe CD95L-Oberflächenexpression war, wie früher beschrieben, ein Abspalten des Liganden von der Zelloberfläche durch Metalloproteinasen (Kayagaki *et al.* 1995, Tanaka *et al.* 1995).

Die für CD95L vermittelte Apoptose sensitiven EBV-B-CD95L zeigten nach der Transduktion mit dem Liganden außerdem eine hohe Spontanapoptose und proliferierten nur begrenzt. Für die Umgehung von para- und autokrin vermittelter Apoptose nach CD95L Transduktion war daher Apoptoseresistenz der verwendeten Zellen eine Voraussetzung.

#### **4.2.2 Erzielung von Apoptoseresistenz in C1R- bzw. C1R-A1 Zellen und natürliche Apoptoseresistenz von Fibroblasten**

Neben EBV-B-Zellen standen die B-Zell-Linien C1R- bzw. C1R-A1 Zellen (s. Abs. 2.1.9.2. Mat/Meth) für die Transfektion mit CD95L zur Verfügung. Wie EBV-B-Zellen exprimierten auch diese Zellen konstitutiv CD95 und waren sensibel für CD95 vermittelte Apoptose. Zur Vermeidung para- und autokriner Apoptoseinduktion sollte vor CD95L-Transfektion Apoptoseresistenz in den B-Zell-Linien erzielt werden.

Für die Transfektion mit CD95L wurden in früheren Studien apoptoseresistente Zellen verwendet: konstitutiv apoptoseresistente Zellen wie humane 293 Zellen (Dulat *et al.*, 2001), murine Myoblasten (Lau *et al.*, 1996), murine Colonsarcom Zellen (Arai *et al.*, 1997), murine WR19L-Zellen (Tanaka *et al.*, 1996, 1998), COS-Zellen (Zelllinie aus Affen-Fibroblasten) (Suda *et al.*, 1993), Zellen, in denen durch Cotransfektion mit einer mutierten Form von FADD (Fas associated death domain) Apoptoseresistenz erzielt wurde (Wu *et al.*, 2001)

oder Zellen von CD95 defizienten lpr/lpr Mäusen (Buonocore *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 1998, 1999, 2000).

Durch Inkubation mit anti-Apo-1 über mehrere Monate konnte eine Apoptoseresistenz in C1R- und C1R-A1 Zellen, nicht jedoch in EBV-B-Zellen erreicht werden. Außerdem gelang es bei C1R-A1 Zellen, eine CD95 negative Variante nach magnetischer Depletion zu selektieren.

Zusätzlich zu B-Zell-Linien wurden Fibroblasten mit CD95L transduziert. Diese Zellen exprimierten nur geringfügig CD95 und wiesen konstitutive Apoptoseresistenz auf.

#### **4.2.3 Lentivirale Transduktion von B-Zell-Linien und Fibroblasten**

Durch die Transfektion von CD95L sollte eine stabile Oberflächenexpression des Moleküls erreicht werden, da für membrangebundenen CD95L (mCD95L) eine hohe cytotoxische Aktivität nach Trimerisierung des Moleküls beschrieben war (Tanaka *et al.* 1998). CD95L wird allerdings, wie oben erwähnt, durch Metalloproteinasen von der Zelloberfläche abgespalten (Tanaka *et al.*, 1996, 1998). Um zu gewährleisten, dass das Molekül nicht von der Oberfläche abgespalten werden kann, wurden Transfektionsversuche mit CD95L DNA durchgeführt, die an der Spaltungsstelle mutiert war (Tanaka *et al.*, 1998). Dennoch führten konventionelle Transfektionsmethoden in apoptoseresistenten C1R-/C1RA1 Zellen nur zu transienter, jedoch nicht zu stabiler CD95L Expression.

So wurde auf ein bereits etabliertes lentivirales Vektorsystem in Kooperation mit T. Wenger und I. Herr am DKFZ Heidelberg zurückgegriffen. Virale Transfektionen zeichnen sich im Vergleich zu konventionellen Methoden meist durch eine deutlich höhere Effizienz aus (Nishikawa und Huang, 2001). Ein Nachteil viraler Transfektionsmethoden ist die Gefahr einer Insertionsmutagenese: Da der virale Vektor stabil in das Genom der transduzierten Zellen integriert wird, können durch diesen Vorgang Tumorsuppressorgene inaktiviert oder Protoonkogene aktiviert werden und so zur Transformation der Zellen führen. Im Rahmen einer Gentherapie für schwere kombinierte Immundefekte führten solche Ereignisse zur Entstehung von Leukämien (Hacein-Bey-Albina *et al.* 2003, Woods *et al.* 2006). Für diese Arbeit war eine potentielle Insertionsmutagenese jedoch nicht von Bedeutung, da die Lebenszeit der viral transduzierten Zellen für die Apoptoseinduktion

durch die Behandlung mit Mitomycin C nur auf wenige Tage begrenzt war und die Zellen ausschließlich *in vitro* verwendet wurden.

Im Vergleich zur retroviralen Transduktion, wie sie für EBV-CD95L verwendet wurde, bot die lentivirale Methode den Vorteil, dass auch in Zellen, die sich nicht oder langsam teilen, ein effizienter Gentransfer erreicht werden kann (Wenger 2005). Da auch langsam proliferierende Fibroblasten transduziert wurden, war die lentivirale Transduktion die Methode der Wahl.

#### **4.2.3.1 CD95L Expression und biologische Funktionalität nach lentiviraler Transduktion**

Apoptoseresistente C1R- und C1R-A1-Zellen und Fibroblasten wurden mittels lentiviralem Vektor mit Wildtyp-CD95L-DNA transduziert. Das verwendete CD95L Konstrukt pCIGW-CD95L war durch das Markergen GFP nachweisbar und ermöglichte die Anreicherung GFP positiver Zellen mit dem Zellsorter nach erfolgreicher Transduktion.

Mehr als 90% der Zellen waren nach lentiviraler Transduktion und Selektion GFP positiv. Obwohl für die Transduktion Wildtyp CD95L verwendet wurde, die nicht an der Spaltungsstelle mutiert war, konnte in apoptoseresistenten C1R- und C1R-A1 Zellen eine hohe, stabile Oberflächenexpression des Liganden erreicht werden, die zu effektiver zytotoxischer Aktivität führte.

Warum mehr als 70% der transduzierten Zellen CD95L an der Oberfläche exprimierten, bleibt indes unklar: für hämatopoetische Zellen war eine vorwiegend intrazelluläre Expression des Liganden, auch nach Transfektion, beschrieben (Bossi und Griffiths, 1999). Nur 5-10% der transduzierten Fibroblasten hingegen exprimierten Oberflächen-CD95L, obwohl nahezu alle Zellen GFP positiv waren. Hier wurde der Ligand vorwiegend intrazellulär exprimiert. Das Expressionsmuster von CD95L in Fibroblasten, die, ebenso wie B-Zellen, mesenchymalen Ursprungs sind, entsprach somit dem für hämatopoetische Zellen beschriebenen Muster (Bossi und Griffiths, 1999). Sowohl in C1R-/C1R-A1-CD95L als auch in Fib-CD95L konnte, wie erwartet, eine Abspaltung und Freisetzung des Liganden ins Kulturmedium nachgewiesen werden. Im Kulturüberstand von Fib-CD95L war im Vergleich zu C1R-/C1R-A1 unter Berücksichtigung der Zellzahl ca. doppelt so viel sCD95L nachweisbar. Dies kann sowohl durch die verstärkte Freisetzung des Liganden als auch durch die Tatsache bedingt sein, dass Fibroblasten 2-5x größer als

C1R/C1R-A1 Zellen sind. Die hohe Freisetzung des Liganden konnte durch proapoptotische Wirkungen (Tanaka *et al.* 1995, 1996, Suda *et al.* 1997, Hohlbaum *et al.* 2000) zur Effektivität der Apoptoseinduktion beitragen.

Die Funktionalität der transduzierten Zellen wurde mittels Cytotox-Assays gesichert, in denen apoptosesensitive Jurkat-Zellen als Targetzellen verwendet wurden.

### 4.3 Strategien zur Depletion alloreaktiver T-Zellen mittels CD95L-exprimierender Zellen

Prinzipiell wurden zwei unterschiedliche Strategien zur Depletion alloreaktiver T-Zellen untersucht:

1. simultane Anwendung von CD95L exprimierender Zellen zur Aktivierung und Apoptoseinduktion
2. sequentielle Aktivierung durch APC und Apoptoseinduktion durch CD95L exprimierende Zellen

In simultanen Ansätzen wurden CD95L transduzierte APC gleichzeitig zur Stimulation und Apoptoseinduktion angewendet. Diesen Ansätzen lag zugrunde, dass T-Zellen, in denen Apoptose induziert werden sollte, durch Antigene der CD95L exprimierenden Zellen stimuliert wurden und in T-Zellen, die simultan eine TCR- und CD95L-Ligation erfahren, Apoptose induziert werden konnte (Lenardo *et al.* 1999, Dulat *et al.* 2001, Strauß *et al.* 2007).

In sequentiellen Kultursystemen wurde die Möglichkeit untersucht, in T-Zellen **nach** erfolgter allogener Stimulation in einem zweiten Schritt mit CD95L transduzierten Zellen Apoptose zu induzieren (Abb. 1.5.a). Grundlage hierfür war, dass alle aktivierten T-Zellen sensitiv für CD95L vermittelte Apoptose sind und unabhängig vom stimulierenden Antigen eliminiert würden (O'Flaherty *et al.* 1997, Dulat *et al.* 2001).

Da die bisherigen Studien bezüglich der Antigenpezifität CD95L vermittelter Apoptose offensichtlich widersprüchlich waren, testeten wir zunächst ein sequentielles System, in dem, ähnlich wie beschrieben (Lau *et al.* 1996), HLA-Identität der Stimulatoren (EBV-B-Zellen) zu den Apoptoseinduktoren (Fibroblasten) vorlag. Alloreaktive T-Zellen wurden im 1. Schritt nach spezifischer TCR/HLA-Interaktion und Costimulation durch EBV-B-Stimulatoren

aktiviert. Im 2. Schritt war zwischen allo-aktivierten T-Zellen und Fibroblasten eine gleichzeitige TCR-/HLA und CD95L/CD95 Ligation zum Zeitpunkt der Apoptoseinduktion möglich, da der HLA-Typ der Fibroblasten mit dem der EBV-B-Stimulatoren identisch war (Abb. 1.5.b.).

In einem weitergehenden sequentiellen System wurde untersucht, ob eine Apoptoseinduktion nach allogener Aktivierung (mit EBV-B-Zellen) auch HLA-unabhängig durch C1R-A1-CD95L erreicht werden konnte (Abb. 1.5.c.).

#### **4.3.1 Simultane HLA-allospezifische Stimulation und Depletion durch lentiviral transduzierte C1R-A1-CD95L**

Nachdem gezeigt wurde, dass C1R-A1-CD95L in Jurkatzellen effektiv Apoptose induzierten, wurden sie in der gemischten Lymphozytenkultur als Stimulatoren und zugleich Apoptoseinduktoren verwendet. In den Primär- und Restimulationskulturen mit C1R-A1-CD95L konnte sowohl eine erhöhte Apoptoserate der CD4+ und CD8+ Zellen, als auch eine Abnahme der Aktivierungsmarker gezeigt werden.

Allospezifische T-Zell-Depletion wurde durch die Verwendung von C1R-A1-GFP Zellen für die Restimulation nachgewiesen: auch in Abwesenheit CD95L-exprimierender Zellen bei der Restimulation war die Proliferation der primär mit C1R-A1-CD95L stimulierten Zellen komplett inhibiert. Die Kontrollstimulation (OKT3/CD28) mit normalen Proliferationswerten schloss aus, dass die Inhibition der allospezifischen Antwort auf eine Zellschädigung zurückzuführen war. Zudem konnte gezeigt werden, dass auch keine spezifische Zytotoxizität der allo-depletierten Zellen gegen C1R-A1-GFP nach Primärstimulation mit C1R-A1-CD95L detektiert werden konnte.

In einer Vielzahl von Publikationen wurden Ansätze zur Immunmodulation mit Hilfe des CD95/CD95L Systems beschrieben. Die meisten dieser Arbeiten beschäftigten sich mit der Induktion von Toleranz in Organ-Transplantations- und/oder Autoimmun-Modellen in murinen Systemen. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von CD95L auf allogenen Zellen unterschiedlicher Herkunft (u.a. dendritische Zellen, Makrophagen, Myoblasten, B-Zellen, Knochenmark-Zellen, Colon-Carcinom-Zellen, Thyroidea-Follikelzellen) HLA-allospezifische Antworten inhibieren und Toleranz induzieren können (Lau *et al.* 1996, Zhang *et al.* 1998,1999, Matsue *et al.* 1999, 2001, Min *et al.* 2000,



Georgantas *et al.* 2000, Wu *et al.* 2001, Tourneur *et al.* 2001, Fleck *et al.* 2001, Whartenby *et al.* 2002, Kosiewicz *et al.* 2002, Wolfe *et al.* 2002, Ichim *et al.* 2003, Hoves *et al.* 2003, 2004).

Trotz dieser Berichte über erfolgreiche Toleranzinduktion, zeigten andere Arbeiten nach Inokulation CD95L-exprimierender Gewebezellen im Tierexperiment eine starke Immunreaktion unter Beteiligung neutrophiler Granulozyten und die daraus resultierende Zerstörung der Transplantate, wodurch die Verwendung CD95L exprimierender Zellen *in vivo* limitiert ist (Allison *et al.* 1997, Kang *et al.* 1997, Takeuchi *et al.* 1999, Buonocore *et al.* 2003).

Dennoch blieb CD95L-vermittelte Apoptose attraktiv für die Anwendung in einem *in vitro* System. So nutzten wie wir mehrere Arbeitsgruppen die Induktion von Apoptose über den CD95/CD95L Weg *in vitro* zur Inhibition alloantigen-spezifischer Immunantwort und GvHD:

Der Einsatz von Antikörpern und chimären Proteinen gegen CD95 führte in murinen (Miwa *et al.* 1999, Hartwig *et al.* 2002, Georgantas *et al.* 2006) und humanen (O'Flaherty *et al.* 1998, Huang *et al.* 2001, Dranitzki Elhalel *et al.* 2003) Studien zwar zur Reduktion alloreaktiver T-Zellen, in keiner dieser Arbeiten wurde jedoch eine komplette Inhibition der allospezifischen Antwort erreicht. Dies entsprach den Erfahrungen unserer eigenen Gruppe: eine effektive Reduktion alloreaktiver T-Zellen ließ sich mit anti-CD95 nicht erzielen (nicht gezeigt).

Studien, in denen humane Zellen mit humaner CD95L DNA transfiziert wurden, um simultan zu stimulieren und Apoptose zu induzieren, wurde von Dulat und Mitarbeitern 2001 und aus unserem Labor (Strauß *et al.* 2007) veröffentlicht.

In der Studie von Dulat wurde die embryonale Nieren Zell-Linie 293 mit CD95L transfiziert, um cytotoxische T-Zellen nach allogener Stimulation (7d) mit CD95L<sup>+</sup> Stimulatoren zu untersuchen und die Frage zu klären, ob eine CD95L Expression die Zellen gegen die Cytolyse durch cytotoxische Effektor-T-Zellen, dem sogenannten *Counter-Attack*, schützen kann. Es wurde eine reduzierte cytotoxische Aktivität der Zellen nach Stimulation mit CD95L exprimierenden 293 Zellen und eine Resistenz der CD95L<sup>+</sup> Targets gegen Cytolyse durch Effektor-T-Zellen gefunden. Die Immunantwort bei Restimulation nach CD95L Exposition war in dieser Arbeit allerdings insgesamt, und nicht allospezifisch inhibiert – auch wenn mit 3<sup>rd</sup>-party Zellen restimuliert wurde, war die Reaktivität

gering. Eine Erklärung hierfür ist die fehlende Expression costimulatorischer Moleküle auf 293-Zellen, wodurch eine Anergie der T-Helfer Zellen induziert worden sein könnte.

Strauß *et al.* transfizierten die in dieser Arbeit vorgestellten apoptoseresistenten C1R- und C1R-A1 Zellen mit membranständigem CD95L und untersuchten die Wirkung dieser Zellen in Langzeitstimulationskulturen. Hier wurde eine fehlende Entwicklung cytotoxischer Effektorzellen und eine komplette Inhibition cytotoxischer Aktivität nach 5 Wochen Stimulation mit C1R.A1.CD95L gefunden. Außerdem war nach 2 Wochen Stimulation mit C1R.A1.CD95L die allospezifische Proliferation deutlich reduziert und nach 4 Wochen auf Mediumwerte herabgesetzt, während Immunantworten auf 3<sup>rd</sup>-party Zellen und bakterielle bzw. virale Antigene erhalten blieben.

Im Vergleich zu dieser Arbeit fanden wir bereits nach Kurzzeitstimulation von 5 Tagen eine effektive Elimination der cytotoxischen und proliferativen Antwort. Eine mögliche Erklärung für die höhere Effektivität unseres Systems könnte in der höheren Konzentration von Stimulatorzellen liegen. Im Vergleich einer T-Zell:Stimulator Ratio von 10:1 in der Arbeit von G. Strauß setzten wir eine Konzentration von 2-3:1 ein. Hierdurch erreichten wir eine maximale Stimulation der T-Zellen, was wiederum zu einer hohen Apoptosesensitivität führte. Eigene Experimente mit einer suboptimalen Aktivierungsrate gingen erwartungsgemäß mit einer nicht effizienten Apoptoseinduktion einher (nicht gezeigt). Durch die hohe Konzentration CD95L exprimierender Zellen war zudem eine maximale Depletion aktivierter, apoptosesensitiver CD95<sup>+</sup> T-Zellen gewährleistet.

Membranständige CD95L-Expression, für welche die effektivste Apoptoseinduktion beschrieben ist (Suda *et al.* 1997, Tanaka *et al.* 1998), konnte in mehr als 70% der transduzierten C1R-A1-Zellen nachgewiesen werden. Von den Zellen ins Medium freigesetzter sCD95L könnte außerdem durch eine proapoptotische Wirkung zur Depletion aktivierter T-Zellen beigetragen haben (Askenasy *et al.* 2005).

Zusammengefasst ist davon auszugehen, dass sowohl die Wahl der Antigen-präsentierenden Zellen mit optimalen stimulatorischen und costimulatorischen Eigenschaften, als auch das Verhältnis CD95L exprimierender APC / T-Zellen für eine effektive Stimulation und Apoptoseinduktion von großer Bedeutung ist.

#### 4.3.1.1 Unspezifische Apoptoseinduktion durch C1R-/C1R-A1-CD95L

Ein Nachteil der hohen cytotoxischen Wirkung von C1R-A1-CD95L war der sogenannte Bystandereffekt: auch nicht aktivierte T-Zellen wurden eliminiert, was zu einem geringen Ertrag viabler T-Zellen nach Kultur mit CD95L exprimierenden Stimulatorzellen führte. Dies stand im Widerspruch zu der Annahme, dass ausschließlich aktivierte humane T-Zellen nach einigen Tagen Apoptosesensitivität erlangen (Owen-Schaub *et al.* 1992, Klas *et al.* 1993, Krüger *et al.* 2003).

Für murine naive Zellen ist eine Sensitivität gegenüber CD95 vermittelter Apoptose beschrieben (Suda *et al.* 1996). Hier wurde postuliert, dass die Aktivierung von T-Zellen zunächst zu Apoptoseresistenz der Zellen führt, während naive „Bystander“ T-Zellen apoptosesensitiv bleiben. Durch Apoptoseresistenz bei gleichzeitiger, aktivierungsinduzierter Expression von CD95L können aktivierte T-Zellen in Bystanderzellen Apoptose induzieren.

Im Gegensatz zum murinen System erbrachte die Untersuchung humaner Zellen durch die gleiche Arbeitsgruppe (Suda *et al.* 1997) das Ergebnis, dass humane, frisch isolierte PBL resistent gegen löslichen CD95L und CD95-AK waren, membranständig CD95L exprimierende Zellen jedoch Apoptose induzieren konnten. Da naive T-Zellen im Gegensatz zu Memory-T-Zellen keinen CD95-Rezeptor exprimierten (Miyawaki *et al.* 1992), folgerten Suda und Mitarbeiter, dass naive Zellen weder durch löslichen noch durch membranständigen CD95L getötet werden können, zeigten aber, dass naive Nabelschnur-T-Zellen durch unspezifische IFN- $\gamma$  und anti-CD28 Stimulation schnell CD95 exprimieren und Apoptosesensitivität erlangen. Auf die Frage, welchen Sinn die Apoptosesensitivität dieser potentiell nützlichen Zellpopulation haben könnte, wurde postuliert, dass naive oder Memory-Bystander Zellen, die durch Cytokine und Costimulatoren unspezifisch mit stimuliert würden, auf diesem Wege eliminiert werden könnten.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen fanden Inaba und Mitarbeiter 1999 murine naive Zellen apoptose-sensibel, während ruhende, antigenspezifische Memory-Zellen eine höhere Resistenz für CD95-AK induzierte Apoptose aufwiesen. In dieser Arbeit wurde CD95 Antikörper zur Apoptoseinduktion verwendet.

Die widersprüchlichen Resultate der unterschiedlichen Gruppen bezüglich der Apoptosesensitivität nicht aktivierter T-Zellen resultieren wahrscheinlich aus

den unterschiedlichen Methoden der Aktivierung (polyklonal/spezifisch) und Apoptoseinduktion (CD95 Antikörper, löslicher CD95L, membrangebundener CD95L).

In unseren Experimenten waren Nabelschnur-MNC resistent gegen C1R-/C1R-A1-CD95L vermittelte Apoptose, während wir Sensitivität in frisch isolierten, adulten MNC fanden, die allerdings deutlich unter der aktivierter T-Zellen lag. Dies führte wahrscheinlich zu der geringen Zellausbeute in unseren Allodepletions-Ansätzen. Gleichwohl blieb in den Proliferationsassays die Antwort auf OKT3/CD28 und damit die Funktionalität der T-Zellen nach CD95L Exposition erhalten. Ob die überlebende Zellpopulation vorwiegend naiven oder Memory-T-Zellen zuzuordnen ist, bleibt noch zu klären. Wenn die Beobachtung von Inaba *et al.* auch für unser System zuträfe, wären von der unspezifischen Apoptoseinduktion v.a. naive T-Zellen betroffen, während antigenspezifische Memory-Zellen erhalten blieben. Dies wäre für die Vorbereitung einer klinischen Anwendung von Vorteil, da vorwiegend naive T-Zellen im Empfänger GvHD verursachen, während Memory-T-Zellen einer allospezifischen Aktivierung nicht zugänglich sein sollten.

Für die Vorbereitung auf eine klinische Anwendung könnte eventuell durch Titrationsversuche die Stimulatoren/Responder Ratio weiter optimiert werden, so dass eine minimale unspezifische Apoptoseinduktion einer ausreichenden Effizienz allospezifischer Depletion gegenübersteht.

#### **4.3.2 Sequentielle HLA-allospezifische Depletion durch CD95L transduzierte Zellen nach allogener Stimulation**

Die Notwendigkeit der Coexpression von CD95L und HLA auf einer Zelle für eine Inhibition allospezifischer Zytotoxizität wurde von G. Strauß und Mitarbeitern (2007) beschrieben. Auch wir konnten zeigen, dass aktivierte T-Zellen effektiv durch C1R-A1-CD95L eliminiert wurden, wenn Stimulation und Apoptoseinduktion durch die gleichen Zellen erfolgte.

Eine klinische Anwendbarkeit eines solchen Systems ist jedoch nicht realisierbar, da für jeden einzelnen Patienten eine CD95L-Transduktion der Empfängerzellen durchgeführt werden müsste und die Verfügbarkeit von DLIs durch den hohen Zeitaufwand dieser Prozedur sehr eingeschränkt wäre.

Daher wurden CD95L exprimierende Zellen als Apoptoseinduktor nach HLA-spezifischer Aktivierung durch („empfängerspezifische“) Zellen eingesetzt: die Aktivierung erfolgte durch EBV-B-Zellen, die Apoptoseinduktion durch C1R-A1-CD95L oder Fib-CD95L. Aktivierung und Apoptoseinduktion fanden hierbei nicht gleichzeitig, sondern sequentiell statt. Das sequentielle System wurde deshalb gewählt, weil bei gleichzeitiger Zugabe von EBV-B-Zellen und CD95L exprimierenden Apoptoseinduktoren zum einen in den CD95-sensitiven EBV-Stimulatoren Apoptose induziert würde, zum anderen evtl. durch sterische Gegebenheiten eine effektive Aktivierung bzw. Apoptoseinduktion der T-Zellen nicht gewährleistet wäre.

#### **4.3.2.1 Sequentielles Depletionssystem unter Beibehaltung von HLA-Identität von Stimulatoren (EBV-B-Zellen) und Apoptoseinduktoren (CD95L transduzierte Fibroblasten)**

In unserem ersten sequentiellen System war HLA-Identität der Stimulatoren und Apoptoseinduktoren gegeben: die Stimulation erfolgte durch EBV-B-Zellen und nachfolgend die Apoptoseinduktion durch CD95L-transduzierte Fibroblasten (Fib-CD95L) des gleichen Spenders.

Unter Verwendung von Fib-CD95L wurde eine erhöhte Apoptoserate der T-Zellen und eine geringere Expression von Aktivierungsmarkern gefunden. Die allospezifische Proliferation und Zytotoxizität war reduziert. Dabei war die Effektivität - wahrscheinlich durch die geringe Oberflächenexpression von CD95L auf den transduzierten Fibroblasten - geringer als im simultanen System mit C1R-A1-CD95L. Prinzipiell konnten wir hier jedoch zeigen, dass Apoptoseinduktion im sequentiellen System möglich war.

#### **4.3.2.2 HLA-allospezifische Depletion durch CD95L transduzierte C1R-A1-Zellen nach sequentieller Stimulation/Apoptoseinduktion**

Da die Effektivität der Allodepletion durch Fib-CD95L nicht zufriedenstellend war, wurden in einem sequentiellen System C1R-CD95L und C1R-A1-CD95L zur Apoptoseinduktion eingesetzt. Diese Zellen wiesen im Gegensatz zu den transduzierten Fibroblasten eine hohe membranständige CD95L Expression auf, so dass eine hohe biologische Aktivität gewährleistet war. Die Primärstimulation wurde mit EBV-B-Zellen durchgeführt, welche zu den Apoptoseinduktoren HLA-different waren. Sowohl C1R-CD95L als auch C1R-

A1-CD95L induzierten Apoptose und reduzierten die Expression von Aktivierungsmarkern in allogenen stimulierten T-Zellen. Hierbei war die Effektivität von C1R-A1-CD95L höher als die von C1R-CD95L, was durch die allmähliche Abnahme der CD95L Expression im Laufe der Kultur von C1R-CD95L (nicht gezeigt) zu erklären war. Daher wurden für die nachfolgenden Experimente ausschließlich C1R-A1-CD95L verwendet. Sowohl allospezifische Proliferation, als auch Zytotoxizität waren nach sequentieller Stimulation mit EBV-B-Zellen und Apoptoseinduktion durch C1R-A1-CD95L komplett inhibiert, während die Proliferation auf 3<sup>rd</sup>-party Zellen normale Werte zeigte.

Nach unserem Wissen konnten wir hier erstmals zeigen, dass eine komplette Inhibition der allospezifischen Proliferation und Zytotoxizität in einem sequentiellen System möglich ist.

In einem ähnlichen Ansatz setzten O'Flaherty und Mitarbeiter (1998) anti CD95-mAK (Klon DX2) und konstitutiv CD95L exprimierende SW20 Colonicarcinom Zellen ein, um nach allogener Stimulation von humanen MNC mit allogenen EBV-B-Zellen Apoptose zu induzieren. Sie konnten maximal eine Reduktion der allospezifischen Proliferation um ca. 45% erreichen, wobei die CD95L exprimierenden SW620 Zellen (selbst bei einem Einsatz von 20:1 SW620:MNC) nicht effektiver waren als CD95-mAK. Mehrere Erklärungen für die geringe Effektivität dieses Systems sind möglich: Die Expression von CD95L auf SW620 wurde mit dem CD95L-Antikörperklon H11 nachgewiesen, der nach unseren Erfahrungen nicht spezifisch für humanen CD95L ist (s. Anhang). SW620 Zellen wurden zudem nur für 8h mit d7 allo-stimulierten T-Zellen kokultiviert, möglicherweise ein zu kurzer Zeitraum. Dennoch wurde hier prinzipiell demonstriert, dass in T-Zell-Stimulationskulturen sequentiell Apoptose induziert werden kann. Auch in weiteren Arbeiten wurde gezeigt, dass Stimulation und Apoptoseinduktion nicht durch die gleichen Zellen erfolgen muss (Lau *et al.* 1996, Dulat *et al.* 2001).

Diese und unsere Ergebnisse stehen im Widerspruch zu einer Studie aus unserem Forschungslabor, in der zur Apoptoseinduktion ebenfalls CD95L exprimierende C1R-/C1R-A1 Zellen verwendet wurden und eine Coexpression von apoptoseinduzierenden m-CD95L und stimulierenden HLA-A1 auf der gleichen APC als unabdingbar für die Vermeidung cytotoxischer Alloreaktivität

gefunden wurde (G. Strauß *et al.* 2007). Mögliche Erklärungen für diesen Widerspruch liegen im unterschiedlichen experimentellen System: Zum einen setzten wir, wie unter Abschnitt 4.1.5. beschrieben, eine fünffach höhere Anzahl an Stimulatoren ein, um eine maximale Aktivierung und damit Apoptosesensitivität der T-Zellen zu erreichen. Auch die Konzentration der Apoptoseinduktoren in unserem System war fünffach höher. Zum anderen wurden in der genannten Studie (apoptoseresistente) Stimulatoren und Apoptoseinduktoren gleichzeitig und nicht sequentiell angewendet. Dies könnte durch sterische Gegebenheiten eine gezielte Apoptoseinduktion in den aktivierten T-Zellen behindert haben, zumal hier m-CD95L exprimierende C1R-Zellen verwendet wurden und löslicher CD95L nicht vorhanden war, so dass Zell-Zell-Kontakt für die Apoptoseinduktion unerlässlich war. Zuletzt verzichteten wir im Gegensatz zu G. Strauß auf die Zugabe von IL-2 zu den Kulturen und arbeiteten mit CD56/CD16 (NK-Zell-) depletierten MNC. Auf diese Weise verhinderten wir die Proliferation apoptoseresistenter, CD56<sup>+</sup> cytotoxischer T-Zellklone (Strauß *et al.* 2003), welche vermutlich NK-T-Zellen zuzuordnen sind (Mittag *et al.* 2005).

Zusammengefasst erreichten wir im sequentiellen System mit C1R-A1-CD95L Zellen eine mit dem simultanen System vergleichbare, hoch effektive Depletion alloreaktiver Zellen. Wir konnten hier erstmals allospezifische Proliferation und Zytotoxizität humaner T-Zellen durch CD95L exprimierende humane Zellen komplett inhibieren, während die Proliferation auf 3<sup>rd</sup>-party Zellen erhalten blieb. Dieses System ist zudem klinisch praktikabel, da individuell allospezifische Donorzellen nach spezifischer Aktivierung durch Empfänger-Zellen durch eine „universell“ einsetzbare, CD95L-exprimierende Zelllinie depletiert werden.

#### **4.4 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen in CD95L-Allodepletionsmodellen**

Einer der Schwerpunkte dieser Arbeit war die Untersuchung CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen im simultanen und sequentiellen Allodepletionsmodell aus folgenden Gründen:

Zum einen fanden wir nach CD95L-Exposition trotz hoher Allodepletionseffizienz einen relativ hohen Anteil nicht apoptotischer CD4<sup>+</sup>

Zellen, die den Aktivierungsmarker CD25 exprimierten. Das Fehlen alloreaktiver Proliferation und Zytotoxizität ließ uns vermuten, dass die CD25 Expression hier nicht mit dem Aktivierungsstatus der Zellen einher ging, sondern es sich vielmehr um CD25 konstitutiv exprimierender regulatorische T-Zellen handeln könnte.

Zum anderen war in einer Anzahl von Arbeiten im Mausmodell gezeigt worden, dass regulatorische T-Zellen GvHD abschwächen oder sogar verhindern konnten (Cohen *et al.* 2002, Taylor *et al.* 2002, Hoffmann *et al.*, 2002, Edinger *et al.* 2003, Trenado *et al.* 2003, 2004, Hoffmann und Edinger 2006, Salomon *et al.* 2006, Bénard *et al.* 2006). In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde die Korrelation einer niedrigen FoxP3 Expression mit einem verstärkten GvHD Risiko in pädiatrischen Patienten nach Stammzelltransplantation beschrieben (Olkinuora *et al.* 2007).

Daher untersuchten wir, ob in unseren Systemen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> erhalten blieben, und führten sowohl phänotypische als auch funktionelle Analysen durch.

#### 4.4.1 Apoptoseresistenz von T<sub>reg</sub> im simultanen Allodepletionssystem

Obwohl über die Apoptosesensitivität von T<sub>reg</sub> Uneinigkeit besteht (Mohamood *et al.* 2006, Chen *et al.* 2007, Fritsching *et al.* 2005, Fritsching *et al.* 2006), warf die Persistenz von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen nach effektiver Allodepletion in unserem System die Frage auf, ob T<sub>reg</sub> in unseren Kulturen nach Apoptoseinduktion durch CD95L erhalten blieben.

Erste Hinweise darauf gaben der positive Nachweis CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen und des mit T<sub>reg</sub> assoziierten Transkriptionsfaktors FoxP3 nach erfolgreicher Allodepletion mit C1R-A1-CD95L.

Für weitergehende Analysen wurden T<sub>reg</sub> mittels CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Selektion angereichert, um den Einfluss anderer Lymphozytenpopulationen (z.B. CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen, aktivierte CD25<sup>+</sup> T-Zellen) auszuschließen. Humane T<sub>reg</sub> lassen sich anhand ihrer CD25 Expression durchflusszytometrisch nicht eindeutig abgrenzen, sondern weisen einen CD25-Fluoreszenzshift auf (Baecher-Allan *et al.* 2004, Fritsching *et al.* 2005). Wie CD95L wird auch CD25 von der Zelloberfläche abgespalten (Rubin *et al.*, 1985). Daher ist, ähnlich wie bei CD95L exprimierenden aktivierten Lymphozyten, die Anzahl der konstitutiv



von  $T_{reg}$  exprimierten CD25 Moleküle wahrscheinlich zu gering, um genügend Antikörper für eine klare Abgrenzung zu binden. Wir führten, wie andere Gruppen vor uns (Jonuleit *et al.* 2001, Ng *et al.* 2001, Jiang *et al.* 2003, Baecher-Allan *et al.* 2004, Suri-Payer *et al.* 2005), eine magnetischen Anreicherung von  $T_{reg}$  durch und konnten einen Aufreinigungsgrad von ca. 65% erreichen, wobei aufgrund des Fluoreszenzshiftes diese Zahl nur als Näherungswert gesehen werden kann.

Wir inkubierten die  $T_{reg}$  angereicherte und - zum Vergleich - eine  $T_{reg}$  depletierte ( $CD4^+CD25^-$ ) Population über einen Zeitraum von 9 Tagen mit C1R-A1-CD95L bzw. C1R-A1<sup>GFP</sup> und bestimmten regelmäßig die spezifische Apoptose der  $CD25^+$  Zellen (auch in der  $T_{reg}$  depletierten  $CD4^+CD25^-$  Fraktion exprimierten die T-Zellen nach Stimulation mit C1R-A1-CD95L bzw. C1R-A1<sup>GFP</sup> den Aktivierungsmarker CD25). Während aktivierte,  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen der  $T_{reg}$  depletierten Fraktion wie erwartet sensibel für CD95L vermittelte Apoptose waren, konnten wir in der  $T_{reg}$  angereicherten Fraktion eine Resistenz der  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen für diesen Apoptoseweg nachweisen.

Sehr interessant war die Beobachtung, dass in beiden Fraktionen CD25 stark exprimierende ( $CD25^{hi}$ ) Zellen eliminiert wurden. Da  $T_{reg}$  auf *in vitro* Stimulation mit Anergie reagieren (Fontenot und Rudensky, 2005), fanden sich aktivierte  $CD25^{hi}$  –T-Zellen nur zu einem geringen Anteil (10 von 60%) in der  $T_{reg}$ -angereicherten Fraktion, stellten aber die Hauptpopulation (22 von 27%) der  $CD25^+$  Zellen in der  $T_{reg}$  depletierten Fraktion nach C1R-A1<sup>GFP</sup> Stimulation. Wir postulierten, dass  $T_{reg}$  in unserem System der CD25 mittel/niedrig ( $CD25^{im/lo}$ ) Population zugehören.

Dies stand scheinbar im Widerspruch zu einer Reihe von Publikationen, in denen  $T_{reg}$  v. a.  $CD25^{hi}$  exprimierenden Fraktionen zugeordnet werden (Baecher-Allan *et al.* 2001, 2004 (anhand funktioneller Analysen), Roncador *et al.* 2005 (anhand der FoxP3 Expression), Fritsching *et al.* 2005 (anhand der FoxP3 Expression)). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die  $CD25^{hi}$  Population in den genannten Arbeiten ausschließlich in frisch isolierten Zellen bestimmt und analysiert wurde. Nach unseren Erfahrungen ist die Fluoreszenzintensität der CD25 Expression nach Aktivierung ca. 10x höher als die der CD25 Expression regulatorischer T-Zellen *ex vivo*. Ob CD25 nach Aktivierung nur von nicht regulatorischen T-Zellen so hoch exprimiert wurde oder auch von der  $T_{reg}$ -

Population, ließ sich anhand unserer Analysen nicht klären und bleibt bislang eine offene Frage.

Um herauszufinden, ob es sich bei der apoptoseresistenten Population tatsächlich um regulatorische T-Zellen handelte, wurden weitere phänotypische und funktionelle Analysen durchgeführt. Die phänotypische Diskriminierung regulatorischer T-Zellen war nach Aktivierung der Zellen besonders schwierig, da die bislang beschriebenen Zellmarker auch von stimulierten, nicht-regulatorischen T-Zellen exprimiert werden.

Wir untersuchten die Expression des *Glucocorticoid Induced TNFR-family-related Receptor* (GITR), ein Molekül, das mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> assoziiert beschrieben wurde (McHugh *et al.* 2002, Shimizu *et al.* 2002). Auffallend war, dass, im Vergleich zu C1R-A1<sup>GFP</sup>-Stimulation, CD25<sup>+</sup> T-Zellen sowohl in der T<sub>reg</sub>-angereicherten als auch in der T<sub>reg</sub>-depletierten Fraktion an d5 nach C1R-A1-CD95L Stimulation deutlich mehr GITR exprimierten (nicht gezeigt). Eine Interpretation dieser Beobachtung war jedoch schwierig, da GITR nach Aktivierung sowohl von CD25<sup>+</sup> als auch von CD25<sup>-</sup> T-Zellen verstärkt exprimiert wurde und hier keine Unterschiede zwischen der T<sub>reg</sub>-angereicherten und der T<sub>reg</sub>-depletierten Fraktion feststellbar waren (nicht gezeigt).

Der Transkriptionsfaktor FoxP3 wurde als linienspezifischer Marker für T<sub>reg</sub> zunächst im Mausmodell klassifiziert (Fontenot *et al.* 2003, 2005). Mutationen im FoxP3 kodierenden Gen führen zu einer schweren Autoimmunerkrankung (IPEX – Immunodysregulation, Polyendokrinopathie, Enteropathie, x-linked) und der analogen spontanen murinen Mutation „scurfy“ (Brunkow *et al.* 2001, Wildin *et al.* 2001, Bennett *et al.* 2001, Fontenot und Rudensky 2005). Die spezifische Expression von FoxP3 in murinen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen wurde erstmals 2003 von Hori und Mitarbeitern beschrieben. FoxP3 ist für die Entwicklung und Funktion von T<sub>reg</sub> essentiell (Hori *et al.* 2003, Gavin *et al.* 2007, Williams und Rudensky 2007) und auch auf nicht regulatorischen T-Zellen konnte durch die Expression des Transkriptionsfaktors Suppressoraktivität erzielt werden (Hori *et al.* 2003, Fontenot *et al.* 2003, Khattri *et al.* 2003).

In unseren Experimenten konnte FoxP3 in der T<sub>reg</sub>-angereicherten Population zu jedem Zeitpunkt der Kultur nachgewiesen werden, auch nach Stimulation mit C1R-A1-CD95L. Überraschend wurde FoxP3 jedoch auch in der T<sub>reg</sub>-depletierten Population exprimiert, allerdings nicht vor Aktivierung und

ausschließlich, wenn mit C1R-A1-CD95L stimuliert wurde (Tab. 4.1.). Die Untersuchung der suppressorischen Aktivität der Zellpopulationen untermauerte dieses Ergebnis: Die T<sub>reg</sub>-angereicherte Population supprimierte T-Zellen nach Stimulation mit C1R-A1<sup>GFP</sup> und noch effektiver nach Stimulation mit C1R-A1-CD95L. Darüberhinaus wurde, analog zur FoxP3-Expression, Suppression gefunden, wenn T<sub>reg</sub>-depletierte Zellen nach Stimulation mit C1R-A1-CD95L nicht aber mit C1R-A1<sup>GFP</sup> einer frischen MLC zugesetzt wurden (Tab. 4.1.).

stimulierte Zellpopulation	Stimulatoren	FoxP3 d0	FoxP3 d5	suppressorische Aktivität
CD4+CD25+	C1R-A1-CD95L	ja	ja	50%
CD4+CD25+	C1R-A1 <sup>GFP</sup>	ja	ja	20-30%
CD4+CD25-	C1R-A1-CD95L	nein	ja	50%
CD4+CD25-	C1R-A1 <sup>GFP</sup>	nein	nein	Nein

**Tab. 4.1.** Übersicht über FoxP3 Expression und suppressorische Aktivität T<sub>reg</sub>-angereicherter (CD4+CD25+) und – depletierter (CD4+CD25-) Populationen nach Stimulation mit C1R-A1<sup>GFP</sup> bzw. C1R-A1-CD95L.

Zwei unterschiedliche Erklärungen sind für dieses Phänomen denkbar: entweder differenzierten CD25<sup>-</sup> FoxP3<sup>-</sup> T-Zellen durch Kultur mit C1R-A1-CD95L in FoxP3 positive T<sub>reg</sub> oder eine geringe, vor Kultur nicht nachweisbare Population FoxP3 positiver T<sub>reg</sub> wurde durch die Stimulation mit C1R-A1-CD95L angereichert, da sie im Gegensatz zu nicht regulatorischen T-Zellen resistent gegen CD95L- vermittelte Apoptose war. Eine durch T-Zell-Aktivierung hervorgerufene Differenzierung von CD25<sup>-</sup>FoxP3<sup>-</sup> T-Zellen in FoxP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> wurde bereits gezeigt (Kretschmer *et al.* 2005, Chang *et al.* 2005). Bei längerer Kulturdauer konnten auch wir in der T<sub>reg</sub>-depletierten Fraktion, die mit C1R-GFP stimuliert wurde, schwache FoxP3-Expression nachweisen (nicht gezeigt), was dafür spricht, dass auch in unserem Kultursystem FoxP3 nach Aktivierung der Zellen exprimiert wurde.

Aufgrund der nachgewiesenen Apoptoseresistenz von CD25<sup>im/lo</sup> exprimierenden T<sub>reg</sub> ist es wahrscheinlich, dass eine durch die Aktivierung neu differenzierte FoxP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Population oder/und eine vor Kultur unter der Nachweisgrenze liegende FoxP3<sup>+</sup> Population nach C1R-A1-CD95L Kultur angereichert wurde. Dagegen wurden nicht apoptoseresistente, aktivierte Effektorzellen durch die CD95L-Exposition depletiert.

Die Apoptosesensitivität von T<sub>reg</sub> wurde in einer Reihe von Publikationen sowohl im murinem (Mohamood *et al.* 2006, Chen *et al.* 2007) als auch im humanen

System (Fritsching *et al.* 2005) untersucht und eine hohe Sensitivität dieser Zellen für CD95L-vermittelte Apoptose beschrieben.

In jeder dieser Arbeiten wurden  $T_{reg}$  aufgrund ihrer  $CD4^+CD25^{hi}$  Expression isoliert und anhand der positiven FoxP3 Expression von regulatorischen T-Zellen ausgegangen. Nur in einer Arbeit wurden die frisch isolierten Zellen auch funktionell analysiert (Mohammod *et al.* 2006).

Zur Ermittlung der Apoptosesensitivität wurde nach CD95L-vermittelter Apoptoseinduktion spezifische Apoptose durch Annexin V Färbung der  $CD4+CD25+$  T-Zellen bestimmt.

In keiner der Arbeiten wurde **nach** Apoptoseinduktion ein Suppressionsassay oder eine FoxP3 Färbung durchgeführt. So ist nicht gezeigt, ob nach CD95L Exposition FoxP3 von den verbleibenden Zellen exprimiert wurde oder ob deren Funktionalität bzw. suppressorische Aktivität erhalten blieb. Eventuell könnte der hohe Anteil apoptotischer Zellen zumindest zum Teil durch das Vorhandensein aktivierter T-Zellen in den  $T_{reg}$ -angereicherten  $CD4+CD25+$  T-Zellen bedingt sein.

Erst kürzlich wurde von B. Fritsching, E. Suri-Payer und Mitarbeitern eine Subpopulation regulatorischer T-Zellen definiert, die sich durch Resistenz gegen CD95L vermittelte Apoptose auszeichnet (Fritsching *et al.* 2006). Die apoptoseresistenten  $T_{reg}$  wurden hier aufgrund ihres Phänotyps ( $CD95^{lo}$ ,  $CD45RO^{lo}$ ,  $CD45RA^{hi}$ ,  $IL7R^{hi}$ ) naiven T-Zellen zugeordnet und die Autoren sprechen von *naiven regulatorischen T-Zellen*. Während deren Häufigkeit im adulten Blut gering war, zeigte die überwiegende Anzahl der  $T_{reg}$  aus Nabelschnurblut diesen naiven Phänotyp und waren ebenso resistent gegen CD95 vermittelte Apoptose. Naive  $T_{reg}$  wurden auch von anderen Gruppen beschrieben (Valmori *et al.* 2005, Seddiki *et al.* 2006). Auf diesen Zellen konnte eine mittlere Expression von CD25 ( $CD25^{im}$ ) nachgewiesen werden, sie exprimierten FoxP3 jedoch in gleichem Maße wie  $CD4+CD25^{hi}$  Treg und zeigten eine vergleichbare suppressorische Wirkung. Die Apoptoseresistenz sowohl der naiven adulten als auch der Nabelschnurblut- $T_{reg}$  wurde von Fritsching und Mitarbeitern anhand der spezifischen Apoptose  $CD4+CD25+$  T-Zellen nach Inkubation mit anti-CD95 oder sCD95L definiert. Auch in dieser Arbeit wurde nach Apoptoseinduktion weder FoxP3 bestimmt, noch ein Suppressorassay durchgeführt.

Im Vergleich zu den genannten Untersuchungen, stellte in unserem System eine besondere Herausforderung dar, dass wir  $T_{reg}$  nicht *ex vivo*, sondern nach Aktivierung und Kultur untersuchen wollten und sich deshalb  $T_{reg}$  phänotypisch nicht von aktivierten Effektorzellen differenzieren ließen. Die Selektion von  $T_{reg}$ -angereicherten bzw. depletierten Zellfraktionen vor Kultur erlaubte uns, die Apoptoseresistenz der  $CD4^+CD25^{im/lo}$  Population nach Stimulation mit C1R-A1-CD95L nachzuweisen. Während in den früheren Arbeiten anderer Gruppen (s.o.) auf eine Untersuchung der FoxP3-Expression und eine Funktionsanalyse der  $T_{reg}$  nach Apoptoseinduktion verzichtet wurde, wiesen wir eine beständige FoxP3 Expression und die volle Funktionalität dieser Zellen nach Apoptoseinduktion durch CD95L nach. Damit stellten wir sicher, dass es sich bei der apoptoseresistenten  $CD4^+CD25^+$  Population nicht um aktivierte T-Effektorzellen handelte.

Darüberhinaus blieben in unserem System FoxP3 exprimierende, suppressorisch wirksame Zellen nach Kultur mit C1R-A1-CD95L nicht nur erhalten, sondern wurden sogar angereichert: zum einen war die suppressorische Aktivität der  $T_{reg}$ -angereicherten Population nach C1R-A1-CD95L-Stimulation höher als nach C1R-A1<sup>GFP</sup>-Kultur, zum anderen konnten wir in der  $T_{reg}$ -depletierten Population nach C1R-A1-CD95L Kultur FoxP3 und suppressorische Aktivität nachweisen (Tab. 4.1.).

#### **4.4.2 Charakterisierung und Funktion von Treg im sequentiellen Allodepletionssystem**

Im Hinblick auf eine potentielle klinische Anwendung wurden auch im hierfür relevanten sequentiellen Kultursystem  $CD4^+CD25^+FoxP3^+ T_{reg}$  untersucht. Auf die Anreicherung bzw. Depletion von  $T_{reg}$  wurde verzichtet, da eine Apoptoseresistenz dieser Zellen vorab nachgewiesen wurde (4.2.1.), und es keine Rolle spielte, dass aktivierte  $CD25^+$  T-Zellen nicht von  $T_{reg}$  differenzierbar waren. Im sequentiellen System sollten vielmehr alle Zellkomponenten vorhanden sein, die für die Depletionsexperimente verwendet wurden, um Depletionseffizienz und den Erhalt von  $T_{reg}$  in einem Experiment vergleichen zu können. Es war zunächst unklar, ob sich in einem solchen Ansatz überhaupt eine Funktion regulatorischer T-Zellen nachweisen lassen würde, da bei Verwendung von MNC mit nicht kontrollierbaren bzw. nicht überschaubaren

Interaktionen der Zellen zu rechnen war. Die Funktionalität nicht aufgereinigter T<sub>reg</sub> in einem MNC-Präparat ist unseres Wissens nach auch bislang nicht von anderen Gruppen überprüft worden.

#### 4.4.2.1 Fehlende Korrelation von FoxP3 Expression und Suppression im sequentiellen Kultursystem

Im sequentiellen Kultursystem wurden MNC in einem ersten Schritt mit EBV-B-Zellen allogenen stimuliert und in einem 2. Schritt durch C1R-A1-CD95L Apoptose induziert.

Wir konnten die Expression von FoxP3 in MNC bereits nach Primärstimulation mit EBV-B-Zellen nachweisen, während vor Stimulation nur wenig FoxP3 nachweisbar war. Dies sprach für eine verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors nach Aktivierung, wie für humane T-Zellen bereits früher gezeigt wurde (Walker *et al.* 2003, Allan *et al.* 2005, Morgan *et al.* 2005, Gavin *et al.* 2006, Wang *et al.* 2007). Ob FoxP3<sup>+</sup> Zellen durch die Aktivierung angereichert, die Neusynthese und Expression des Transkriptionsfaktors in den einzelnen Zellen verstärkt, oder in ursprünglich FoxP3<sup>-</sup> Zellen induziert wurden, konnte durch diese Experimente nicht geklärt werden.

Auch im sequentiellen Kultursystem blieb nach CD95L Exposition die FoxP3-Expression sowohl nach Kultur mit C1R-A1-GFP als auch mit C1R-A1-CD95L erhalten. Die suppressorische Funktionalität der kultivierten Zellen wurde in einem Suppressorassay überprüft, indem diese zu einer frischen MLC gegeben wurden. Obwohl FoxP3 in allen Ansätzen nachgewiesen werden konnte, fanden wir suppressorische Aktivität ausschließlich, wenn Zellen verwendet wurden, die mit C1R-A1-CD95L inkubiert worden waren (Tab. 4.2.).

stimulierte Zellpopulation	Stimulatoren	FoxP3 d0	FoxP3 d5	sekundäre Kokultur/ Apoptose-induktion	FoxP3 d8	suppressorische Aktivität
MNC	EBV-B-Zellen	nein	ja	C1R-A1 <sup>GFP</sup>	ja	nein
MNC	EBV-B-Zellen	nein	ja	C1R-A1-CD95L	ja	50%

**Tab. 4.2.** Übersicht über FoxP3 Expression und suppressorische Aktivität von MNC nach sequentieller Kultur mit EBV-B-Zellen und C1R-A1-CD95L bzw. C1R-A1<sup>GFP</sup>.

Neben Studien, in denen eine Korrelation der FoxP3-Expression mit der suppressorischen Wirkung von humanen T-Zellen nach Stimulation (Walker *et al.* 2003) oder Transduktion mit FoxP3 (Yagi *et al.* 2004) gefunden wurde, mehrten sich in neuerer Zeit Berichte, die eine fehlende Korrelation von FoxP3-Expression und suppressorischer Aktivität zeigten: Die verstärkte Expression von FoxP3 nach Aktivierung CD4<sup>+</sup> und/oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen ging nicht notwendigerweise mit einer suppressorischen Aktivität dieser Zellen einher (Morgan *et al.* 2005, Gavin *et al.* 2006, Wang *et al.* 2007, Ziegler 2007). Wurden humane CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen mit FoxP3 transduziert, erlangten die Zellen, wie T<sub>reg</sub>, einen anergen Phänotyp, sie proliferierten nicht nach TCR-Stimulation und zeigten eine signifikant erniedrigte IL-2-Produktion. Dennoch konnte trotz einer mit T<sub>reg</sub> vergleichbaren FoxP3-Expression keine suppressorische Wirkung der transduzierten Zellen erzielt werden (Allan *et al.* 2005). Ähnliche Beobachtungen wurden in einer Studie mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen aus Nabelschnurblut gemacht: diese exprimieren FoxP3 in gleichem Maße wie adulte Treg, konnten jedoch allogene Immunantworten nicht supprimieren (Chang *et al.* 2005).

Unsere Ergebnisse stützen die Beobachtung, dass FoxP3 Expression in humanen T-Zellen nicht zwingenderweise mit einer suppressorischen Wirkung einher geht und dass daher FoxP3 keinen spezifischen Marker für humane T<sub>reg</sub> darstellt.

Die Untersuchung der suppressorischen Funktion zusätzlich zur CD4, CD25 und FoxP3 Expression in unserem sequentiellen Kultursystem zeigte hingegen, dass funktionale regulatorische T-Zellen nach CD95L-Exposition erhalten blieben bzw. sogar angereichert wurden.

#### **4.4.2.2 Antgenspezifität von T<sub>reg</sub> im sequentiellen Kultursystem**

Ob die regulatorische Funktion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen antigenspezifisch oder –unspezifisch erfolgt, konnte bislang nicht vollständig geklärt werden. Nach aktueller Vorstellung gewinnen T<sub>reg</sub> nach erster, spezifischer Aktivierung über ihren genuinen TCR generelle suppressorische Kapazität und inhibieren Immunfunktionen antigen-unspezifisch (Thornton und Shevach 2000, Boettler *et al.* 2005, Orentas *et al.* 2006). Ein antigen-spezifischer Einsatz von T<sub>reg</sub> zur Unterdrückung von

Immunreaktionen wäre unter diesen Voraussetzungen nicht möglich, da generelle Immunsuppression die Folge wäre.

Studien in denen  $T_{reg}$  antigen-spezifisch expandiert wurden, waren bezüglich ihrer antigenspezifischen Funktion wenig aussagekräftig (Nishimura *et al.* 2004, Hoffmann *et al.* 2004, Godfrey *et al.* 2004-2).

Mittlerweile ist jedoch klar, dass  $T_{reg}$  zwar eine generelle Suppression ausüben können, aber in einer deutlich geringeren Effektivität als antigenspezifische  $T_{reg}$ . So zeigten Shevach und Mitarbeiter (2006), dass in einem transgenen  $T_{reg}$ -Mausmodell die Suppression durch 50 000 antigenspezifische  $T_{reg}$  mit der von  $10^6$  polyklonalen  $T_{reg}$  vergleichbar war.

Auch andere Studien untermauern die hohe Effektivität antigenspezifischer bzw. alloantigenspezifischer  $T_{reg}$ . In einem *in vivo* Mausmodell konnte gezeigt werden, dass allospezifische  $T_{reg}$  in der Lage waren, GvHD komplett zu inhibieren, während die Verabreichung von  $T_{reg}$ , die mit 3<sup>rd</sup>-party Zellen stimuliert worden waren, die Entstehung einer GvHD nur leicht verzögerten. Bei der Verabreichung empfängerspezifischer  $T_{reg}$  blieb außerdem der Graft-versus-Leukämie (GvL)-Effekt erhalten (Edinger *et al.* 2003, Trenado *et al.* 2003). Die Entstehung von autoimmunem Diabetes im NOD Mausmodell konnte durch antigen-spezifisch aktivierte und expandierte, aber nicht durch polyklonale  $T_{reg}$  inhibiert werden (Tang *et al.* 2004, Tarbell *et al.* 2004). Hayashi und Mitarbeiter untersuchten das TCR-Repertoire von  $T_{reg}$  nach Stimulation und fanden prinzipiell die gleiche Antigenerkennung und TCR-Modifikation wie bei Effektorzellen ( $T_{eff}$ ). Ag-spezifische Proliferation und TCR-Modifikation von  $T_{reg}$  waren allerdings geringer als bei  $T_{eff}$ . (Hayashi *et al.* 2004). Eine 3-10 fach höhere suppressorische Wirkung durch alloantigen-spezifische Treg konnte *in vitro* und *in vivo* gefunden werden, wenn für den Suppressorassay das Original-Alloantigen im Vergleich zu 3<sup>rd</sup>-party Zellen verwendet wurde (Yamazaki *et al.* 2006). Eine allospezifische Maus-CD25<sup>+</sup> T-Zell-Linie konnte durch autologe dendritische Zellen (DC), die mit einem MHC I H-2<sup>k/b</sup> Peptid gepulst waren, generiert werden. Diese FoxP3<sup>+</sup>  $T_{reg}$ -Linie zeigte Antigenspezifität für H-2<sup>k/b</sup> *in vitro* und *in vivo* (Golshayan 2007). Ebenfalls im Mausmodell, wurde nach Stimulation mit dendritischen Zellen, die das Antigen Hämagglutinin (HA) präsentierten, eine Differenzierung naiver T-Zellen in FoxP3<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen und deren antigenspezifische Suppression *in vivo* gefunden (Kretschmer *et al.* 2005).



In einem ähnlichen Ansatz wurden humane HA-spezifische  $T_{reg}$  aus  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen generiert. Antigen-spezifische  $T_{reg}$  wurden mittels HLA-Klassell Tetrameren isoliert, die spezifisch für HA sind. Die generierten  $T_{reg}$  supprimierten aber auch die Immunreaktion auf Tetanustoxin, wenn gleichzeitig mit HA stimuliert wurde, ein Vorgang, der als Bystandersuppression bezeichnet wurde (Walker *et al.* 2005). Durch den höheren Polymorphismus des humanen MHC-Lokus im Vergleich zum murinen ist diese höhere Kreuzreaktivität humaner  $T_{reg}$  zu erklären. Bystandersuppression wurde auch in einer weiteren Arbeit mit humanen Zellen gefunden, in der HLA-A2 spezifische  $T_{reg}$  durch DC induziert wurden. Zwar konnte auch hier eine antigen-spezifische Suppression nachgewiesen werden wenn zusätzlich zu HLA-A2 jedoch Pathogene von den DC präsentiert wurden, fand auch hier eine Suppression der immunologischen Antwort statt (Jiang *et al.* 2003). HLA-A2-spezifische humane  $T_{reg}$  ließen sich durch OKT3/CD28 expandieren, exprimierten FoxP3 auch nach der Expansion und behielten anerge und suppressorische Eigenschaften (Jiang *et al.* 2006).  $T_{reg}$ , die aus peripherem Blut asymptomatischer HIV-infizierter Personen isoliert wurden, vermittelten antigen-spezifische Immunsuppression (Kinter *et al.* 2004). In einer weiteren Arbeit mit humanen Zellen wurden  $T_{reg}$  aus Nabelschnurblut und adultem Blut durch Stimulation mit unreifen DC generiert. Die induzierten  $T_{reg}$  waren alloantigen-spezifisch: sie supprimierten T-Zellen nur, wenn zu deren Stimulation die gleichen dendritischen Zellen verwendet wurden, wie zur Induktion der  $T_{reg}$ , nicht aber bei Verwendung von 3<sup>rd</sup>-party Zellen (Chang *et al.* 2006).

Wie unter 4.2.2. diskutiert, fanden wir eine suppressorische Wirkung im sequentiellen System nur dann, wenn mit C1R-A1-CD95L kokultiviert wurde. Wenn die ursprünglichen Stimulatoren (EBV-B-Zellen) für den Suppressorassay verwendet wurden, konnte im Vergleich zu 3<sup>rd</sup>-party Zellen eine deutlich effektivere Suppression nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis spricht eher für alloantigen-spezifische als für generelle Suppression im sequentiellen System.

Daher lassen unsere Ergebnisse die Interpretation zu, dass  $T_{reg}$  unspezifisch supprimieren, wenn sie in hoher Konzentration verwendet werden (Abschnitt 3.4.2.4.2.), antigen-spezifische  $T_{reg}$  jedoch in geringerer Konzentration effektiv supprimieren, wie bereits früher beschrieben (Shevach *et al.* 2006, Koenen und Joosten, 2006).

Nach diesen Erkenntnissen ist die Verwendung alloantigen-spezifischer  $T_{reg}$  ein vielversprechender Ansatz für die Induktion von Transplantationstoleranz und die Prävention von GvHD nach HLA-haploidentischer SCT.

#### **4.5 CD95L und $T_{reg}$ : Zusammenspiel zweier Mechanismen für die hocheffiziente Reduktion von Alloreaktivität**

Wie unter 4.3.1. und 4.3.2. diskutiert, erreichten wir sowohl im simultanen als auch im sequentiellen Allodepletionsmodell durch Kokultur mit CD95L exprimierenden C1R-A1 Zellen eine komplette Inhibition der proliferativen und zytotoxischen Alloreaktivität *in vitro*. Diese hohe Effektivität war sicher teilweise durch eine optimale Stimulation, Erreichen maximaler Apoptosesensitivität der stimulierten Zellen und Einsatz einer ausreichenden Anzahl CD95L-exprimierender Zellen zur Apoptoseinduktion zu erklären. Da wir jedoch zusätzlich eine Anreicherung funktionaler  $T_{reg}$  nach CD95L induzierter Apoptose in unseren Kultursystemen nachweisen konnten, ist die Vermutung naheliegend dass  $CD4^+CD25^+$   $T_{reg}$  an der Effizienz des Systems beteiligt waren. Dass die Immunantwort auf 3<sup>rd</sup>-party Zellen und polyklonale Stimulation nach Allodepletion erhalten blieb, spricht wie das Ergebnis der durchgeführten Suppressionsassays außerdem für eine antigenspezifische Wirkungsweise der  $T_{reg}$  in den Kulturen.

Bislang wurden zwei klinische Studien zur Verabreichung allodepletierter T-Zellen mit dem Ziel einer beschleunigten Immunrekonstitution nach HLA-haploidenter Stammzelltransplantation publiziert (André-Schmutz *et al.* 2002, Amrolia *et al.*, 2006). In beiden Studien wurden alloreaktive T-Zellen mittels anti-CD25-Immunotoxin (IT) eliminiert. In unserer eigenen Gruppe wurde in einer klinischen Studie die Anwendung von T-Zellpräparaten getestet, in denen alloreaktive T-Zellen aufgrund ihrer Aktivierungsmarkerexpression (u.a. CD25) magnetisch depletiert waren (Ege *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Die Resultate unserer eigenen und der genannten Studien zeigten, dass das Verabreichen allodepletierter T-Zell-Transplantate, in denen mittels Antikörper oder Immunotoxin  $CD25^+$  Zellen eliminiert wurden, immer noch mit einem anhaltendem GvHD Risiko verbunden ist (André-Schmutz *et al.* 2002, Amrolia *et al.*, 2006, Ege *et al.*):

In der Arbeit unserer Gruppe (Ege *et al.*) wurde zunächst unspezifisch durch L-Leucyl-L-Leucin-Methylester (LLME) in cytotoxischen T-Zellen Apoptose induziert. Spezifisch wurden dann nach allogener Aktivierung alloreaktive T-Zellen mittels Antikörper gegen die Aktivierungsmarker CD25, CD69, HLA-DR und CD71 magnetisch depletiert. Die residuelle allospezifische Proliferation war auf 0,12%-3,4% reduziert und die cytotoxische Aktivität komplett inhibiert. Die Effektivität der Allodepletion wurde zudem in einem sogenannten *Skin-Explant-Modell* gesichert, in dem empfängerspezifisch allodepletierte T-Zellen mit einem Hautbiopsat des Empfängers inkubiert wurden. Nach Verabreichung von  $\leq 5 \times 10^4$  allodepletierten T-Zellen/kg Körpergewicht konnte in den Patienten eine periphere Expansion der T-Zellen nachgewiesen werden. Trotz hoher *in vitro* Effektivität dieser Allodepletions-Methode entwickelten 2 von 3 Patienten eine GvHD (Ege *et al.*). Dieses unbefriedigende Ergebnis war auch insofern nicht erwartet, als in einer früheren Studie ein Grenzwert von  $5 \times 10^4$  T-Zellen/kg Körpergewicht (nicht allodepletiert) definiert wurde, die ohne Risiko einer GvHD infundiert werden konnten (Müller *et al.* 1999) und führte zum Abbruch der Studie.

In den klinischen Studien von André-Schmutz bzw. Amrolia und Mitarbeitern wurde anti-CD25-Immunotoxin (IT) zur Elimination aktivierter, alloreaktiver T-Zellen verwendet. *In vitro* lag die residuelle allospezifische Proliferation der Arbeiten von André-Schmutz und Amrolia bei <1-5% bzw. <1-4%. In der Studie von André-Schmutz entwickelten 4 von 12 pädiatrischen Patienten nach haploidenter SCT und Verabreichung allodepletierter T-Zellen eine akute GvHD. Eine periphere Expansion der verabreichten T-Zellen konnte hier nicht immer nachgewiesen werden. In der Studie von Amrolia war eine periphere Expansion der T-Zellen gegeben, wenn  $1 \times 10^5$  depletierte T-Zellen/kg Körpergewicht ein- oder mehrmals verabreicht wurden. 3 der 8 pädiatrischen Patienten entwickelten GvHD. Auffallend in beiden Studien mit anti-CD25-IT ist die hohe T-Zell-Menge, die für deren periphere Expansion benötigt wurde. Diese lag zwischen  $1-8 \times 10^5$  Zellen/kg Körpergewicht (André-Schmutz *et al.* 2003, Amrolia *et al.* 2006).

Zusammenfassend kann aus diesen Studien geschlossen werden, dass die für die Immunrekonstitution benötigte T-Zellmenge abhängig von der Allodepletionsmethode war und außerdem ein GvHD-Risiko bestehen blieb, auch wenn eine T-Zell Menge infundiert wurde, die ursprünglich als sicher für

die Vermeidung von GvHD definiert wurde (Müller *et al.* 1999). Insgesamt lassen diese Resultate vermuten, dass die Depletion CD25<sup>+</sup> T-Zellen die Anzahl und Funktion CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen beeinträchtigen könnte und sich daher GvHD nicht vermeiden ließ.

Verschiedene Studien beschäftigten sich mit der Frage nach dem Einfluss von anti-CD25 auf die Anzahl und Funktion von T<sub>reg</sub>. Die Anwendung von anti-CD25 oder anti-CD25-IT (an Diphtherietoxin gekoppeltes IL-2) im Mausmodell *in vivo* führte zu einer Reduktion CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen, während FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen nachweisbar blieben (Kohm *et al.* 2006, McNeill *et al.* 2007, Litzinger *et al.* 2007, Kreijveld *et al.* 2007). Die Untersuchung der Funktionalität der FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen erbrachte widersprüchliche Ergebnisse (Kohm *et al.* 2006, Kreijveld *et al.* 2007).

Kürzlich wurden Resultate einer Studie publiziert, in der T<sub>reg</sub> nach *ex vivo* Behandlung mit anti-CD25-IT untersucht wurden. Wie in den o.g. Studien (André-Schmutz *et al.* 2003, Amrolia *et al.* 2006) wurden hier alloreaktive T-Zellen mittels anti-CD25 Immunotoxin *in vitro* depletiert, hier allerdings in einer HLA-identen (Geschwister) Konstellation älteren Patienten nach SCT verabreicht (Mielke *et al.* 2007). Nach vollständiger Depletion CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen wurde FoxP3 auf CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen im Donor-Lymphozytenpräparat nachgewiesen, die Funktion dieser Zellen jedoch nicht untersucht. 30 Tage nach SCT und Verabreichung der IT-behandelten T-Zellen konnten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut der Patienten nachgewiesen werden. Die Autoren gingen deshalb von einer raschen Rekonstitution der T<sub>reg</sub> aus. Nach unseren Ergebnissen ist dieser Schluss jedoch ohne eine Untersuchung der Funktionalität der potentiellen T<sub>reg</sub> nicht zuverlässig, da FoxP3 auch nach Aktivierung exprimiert wurde und FoxP3-Expression nicht immer mit suppressorischer Aktivität einherging (s. Abschnitt 4.4.2.1).

Aus den bislang publizierten Daten lässt sich demnach nicht ausschließen, dass die Funktion von T<sub>reg</sub> nach Allodepletion mittels anti-CD25-AK bzw. -IT beeinträchtigt wurde.

Da T<sub>reg</sub> für die Ausbildung von Toleranz und Vermeidung von GvHD nach Stammzelltransplantation von großer Bedeutung sind (Cohen *et al.* 2002, Taylor *et al.* 2002, Hoffmann *et al.*, 2002, Edinger *et al.* 2003, Trenado *et al.* 2003, 2004, Hoffmann und Edinger 2006, Salomon *et al.* 2006, Bénard *et al.* 2006,

Olkinuora *et al.* 2007), ist deren Erhalt in Donor-Lymphozyten-Präparaten absolut erstrebenswert.

In einem hypothetischen Transplantationsmodell favorisieren Martinic und v. Herrath (2006), die Verabreichung allo-antigenspezifischer, mit OKT3/IL2 expandierter T<sub>reg</sub> in Kombination mit der systemischen und intrathymischen Verabreichung von Stammzellen. Auf diese Weise wären Donor-APC im Thymus vorhanden, wenn die thymische Selektion der heranreifenden Donor T-Zellen stattfindet. So würden selbst-, fremd-, und alloantigenspezifische T<sub>reg</sub> induziert und ein diverses T-Zell Repertoire selektiert werden, was eine lebenslange Transplantationstoleranz bei optimalen pathogen-spezifischen T-Zell-Antworten erlauben würde. Auch bei Realisierung dieses Modells bliebe in der HLA-haploidenten Konstellation die lange Zeit der Immundefizienz zu überbrücken, bis Donor-T-Zellen ausgereift sind.

In dieser Arbeit wurde für die Anwendung von Donor-Lymphozyten-Präparaten nach haploidenter Stammzelltransplantation eine Methode entwickelt, mit der allospezifische T-Zellen durch CD95L-exprimierende B-Zellen effektiv depletiert wurden, ohne dass Funktion oder Vorhandensein CD4+CD25+FoxP3+ regulatorischer T-Zellen davon beeinträchtigt wurden. Die Kombination aus CD95-vermittelter Apoptose und Suppression durch antigenspezifische T<sub>reg</sub> führte zu vollständiger Inhibition der allospezifischen Immunantwort

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde die Depletion alloreaktiver T-Zellen mittels CD95L exprimierender Zellen mit dem Ziel einer möglichen Anwendung von Donor-Lymphozyten-Präparaten nach allogener Stammzelltransplantation (SCT) untersucht. Die Infusion von Donor-Lymphozyten soll vor allem nach haploidenter SCT, bei der hochaufgereinigte Stammzellen verabreicht werden, die benötigte Zeit der Immunrekonstitution verkürzen.

Dem Ansatz, CD95L exprimierende Zellen zur Allodepletion zu verwenden, lag die Tatsache zugrunde, dass vor allem aktivierte T-Zellen sensitiv für CD95L-vermittelte Apoptose wurden, während nicht aktivierte T-Zellen eher eine Resistenz gegenüber CD95L aufwiesen. Unter Anwendung gemischter Lymphozytenkulturen zur allogenen Stimulation wurde untersucht, ob CD95L exprimierende Zellen in diesen Kultursystemen effizient Apoptose induzieren können. Dafür erfolgte die Apoptoseinduktion durch lentiviral CD95L transduzierte B-Zell-Linien oder Fibroblasten entweder simultan zur – oder sequentiell nach – allogener Aktivierung der T-Zellen.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl allospezifische Proliferation als auch Zytotoxizität nach simultaner Aktivierung und Apoptoseinduktion durch die CD95L exprimierende B-Zell-Linie C1R-A1-CD95L vollständig inhibiert waren. Da diese Zell-Linie ausschließlich HLA-A1 spezifisch stimuliert – und Apoptose induziert, wurde hierdurch zwar die Effektivität der Apoptoseinduktion demonstriert, ohne jedoch klinisch praktikabel zu sein.

Im nächsten Schritt wurde für eine potentielle klinische Anwendung ein sequentielles Kultursystem entwickelt, in dem eine EBV-transformierte B-Zell-Linie zur allogenen Stimulation verwendet und nachfolgend Apoptose durch CD95L-exprimierende Zellen induziert wurde. Auch in diesem System zeigten wir eine effektive Inhibition der Immunantwort: *in vitro* war keine residuale Alloreaktivität mehr nachweisbar. Der Vorteil des sequentiellen Kultursystems liegt in der universellen Einsetzbarkeit einer CD95L-exprimierenden Zell-Linie für die Depletion individueller, HLA-spezifisch stimulierter T-Zellen.

Da  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ) für die Unterdrückung alloreaktiver Immunreaktionen und GvHD (Graft-versus-host-disease) nach

SCT von großer Bedeutung sind, wurde außerdem deren Präsenz und Funktion nach erfolgter Apoptoseinduktion analysiert.

Sowohl im simultanen als auch im sequentiellen Kultursystem blieben funktionelle  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$   $T_{reg}$  erhalten.  $T_{reg}$ , die hier durch eine mäßiggradige CD25 Expression charakterisiert waren, erwiesen sich als resistent gegenüber CD95L vermittelter Apoptose und wurden in den Kulturen mit C1R-A1-CD95L sogar angereichert. Interessanterweise ging die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3, welcher für die Funktion von  $T_{reg}$  essentiell ist, nicht konstant mit einer suppressorischen Wirkung einher. Erstmals wurde Funktion und FoxP3-Expression **nach** Apoptoseinduktion untersucht und somit sichergestellt, dass es sich bei der residualen  $CD4^+CD25^+$  Population tatsächlich um regulatorische T-Zellen handelte. Außerdem deuten unsere Ergebnisse auf eine antigenspezifische Funktion der erhaltenen  $T_{reg}$ , was für eine klinische Anwendung von Bedeutung ist, da sonst das Risiko einer generellen Immunsuppression bestünde.

Im Rahmen der Dissertation wurde eine Methode zur Depletion alloreaktiver T-Zellen mittels CD95L exprimierender B-Zell-Linien entwickelt, ohne dass regulatorische T-Zellen von der Apoptoseinduktion betroffen waren. Die Kombination aus selektiver Apoptoseinduktion alloge stimulierter T-Zellen und Suppression residualer Alloreaktivität durch  $T_{reg}$  führte zu einer maximalen Effektivität des Systems und eröffnet vielversprechende Möglichkeiten für eine therapeutische Nutzung.

## V SUMMARY

Within the project as presented in this thesis, depletion of alloreactive human T-cells by CD95L-expressing cells was examined, aiming at transfer of donor-lymphocyte-infusions after allogeneic stem-cell-transplantation (SCT). Specifically after HLA-haploidentical SCT with highly purified stem cells, application of donor-lymphocytes could reduce the required time for immune-reconstitution of donor-derived T-cells.

Using a mixed-lymphocyte-culture system for stimulation of HLA-alloreactive T-cells, the approach of CD95L expressing cells as stimulator cells for allodepletion was based on the fact that stimulated T-cells are highly sensitive towards CD95L-mediated apoptosis, while unstimulated T-cells are rather resistant. It was investigated, whether stimulation by CD95L-expressing cells could result in efficient apoptosis in simultaneous or sequential culture systems. To this extent, induction of apoptosis by lentivirally transduced CD95L-expressing B-cell-lines or fibroblasts was carried out either simultaneously to – or sequentially after – allogeneic activation of T-cells.

It was demonstrated, that allospecific proliferation and cytotoxicity after simultaneous activation and induction of apoptosis were completely abolished by the CD95L-expressing B-cell-line C1R-A1-CD95L. Although we could demonstrate high effectivity of allodepletion, this system was not of clinical practicability because of solely HLA-A1 specific stimulation and apoptosis-induction by C1R-A1-CD95L.

As a next step, a sequential culture system was developed for potential clinical use: an EBV-transformed B-cell-line was used for HLA-specific, allogeneic stimulation and apoptosis was induced in a second step by CD95L-expressing cells. In this system, we demonstrated effective inhibition of allogeneic immunoreactions after sequential activation and induction of apoptosis by CD95L: residual alloreactivity was abrogated. The advantage of this sequential culture system is the universal applicability of a CD95L-expressing cell-line for depletion of individually, HLA-specific allogeneic stimulated T-cells - thereby clinical applicability is given in principle.

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T-cells (T<sub>reg</sub>) have been proven of great importance for prevention and amelioration of alloreactive immune reactions and Graft-versus-host-Disease after SCT. Therefore, presence and function of



T<sub>reg</sub> was examined after stimulation and induction of apoptosis by CD95L-expressing cells.

In both culture systems, simultaneous and sequential, functional CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> were preserved. T<sub>reg</sub> with intermediate CD25 expression were resistant towards CD95L mediated apoptosis and even enriched after culture with C1R-A1-CD95L. Interestingly, expression of the transcription factor FoxP3 did not necessarily correlate with suppressive function. Function of T<sub>reg</sub> and expression of FoxP3 was examined **after** induction of apoptosis for the first time. It was proven that indeed residual CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells were regulatory T-cells, and, furthermore, our results indicate antigen-specific function of residual T<sub>reg</sub>. This is of great importance for potential clinical use to prevent the risk of an otherwise general immune-suppressive function by T<sub>reg</sub>.

In summary, the work presented in this thesis provides a method for effective depletion of alloreactive T-cells without affecting regulatory T-cells by using a CD95L-expressing B-cell-line. The combination of selective induction of apoptosis in stimulated, HLA-alloreactive T-cells and suppression of residual alloreactivity by T<sub>reg</sub> resulted in a highly efficient system and opens promising options for therapeutic applications.

## 6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AB, AK	Antibody, Antikörper
AICD	Aktivierungs-Induzierter-Zelltod
AV	Annexin V
BC	Buffy Coat
BSA	Bovine Serum Albumin
CB	Cord-Blood, Nabelschnurblut
CD	Cluster of Differentiation, Oberflächenantigene (Marker) auf Leukozyten, welche die immunphänotypische Differenzierung der Zellen erlauben.
CD3	T-Zell-Marker
CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	i.A. cytotoxische T-Zellen
CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	i.A. T-Helfer-Zellen
CD25	$\alpha$ -Kette des Interleukin-2-Rezeptors, wird von regulatorischen und von aktivierten T-Zellen exprimiert
CD34	Stammzell-Marker
CD56	NK-Zell-Marker
CD95	= APO1= Fas; Rezeptor, der nach Bindung an den Liganden die Zelltod-Signalkaskade auslöst
CD95L	CD95 Ligand = APO1L= FasL; bindet an CD95
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalie-Virus
cpm	counts per minute
DC	Dendritische Zellen, dendritic cells
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DISC	Death-Inducing-Signalling-Complex, Todesinduzierender Signalkomplex
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DLI	Donor-Lymphozyten-Infusion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Ebstein-Barr-Virus
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Fab-Fragment	antikörperbindendes Fragment (antigen binding Fragment) von Immunglobulinen
Fc-Fragment	kristallisierbares (konstantes) Fragment (Fragment cristallizable) von Immunglobulinen
FCS	Fetal Calf Serum, Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter, Vorwärts-Lichtstreuung
G-CSF	Granulozyten- Colony Stimulating Faktor
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen- Colony Stimulating Faktor
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
gld-Maus	CD95L-defiziente Maus (CD95L-Mutation)
GvHD	Graft versus Host Disease
GvL	Graft versus Leukemia
Gy	Gray, Dosiseneinheit der Bestrahlung

HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IT	Immunotoxin
kDa	kiloDalton
KMT	Knochenmarktransplantation
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
lpr-Maus	CD95-Rezeptor defiziente Maus (CD95-Mutation)
mAB, mAK	monoclonal Antibody, monoklonaler Antikörper
MACS	Magnetic Absorbant Cell Separation, Magnetische Zellseparation
mCD95L	membrangebundener CD95-Ligand
MHC	Major Histokompatibility Complex
MLC	Mixed Lymphocyte Culture, Gemischte Lymphozytenkultur
MNC	Mononuclear Cells, Mononukleäre Zellen
MPI	Metalloproteinaseinhibitor
mRNA	messenger RNA, Boten RNA
MSFI	Mean Shift in Fluorescence Intensity
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
OKT3	anti-CD3 Antikörper
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBSCT	Periphere Blut-Stammzell-Transplantation
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	Phycoerythrin, gekoppelt an den Cyaninfarbstoff Cy5
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phythämagglutinin
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RPMI Medium	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription Polymerasekettenreaktion
sCD95L	löslicher (soluble) CD95-Ligand
SCID	Severe combined immune deficiency, Schwerer kombinierter Immundefekt
SCT	Stemcelltransplantation, Stammzelltransplantation
SFM	Serumfreies Medium
SSC	Side Scatter, Seitwärts-Lichtstreuung
TCR	T-Zell Rezeptor
Th-1/ Th-2	T-Helfer Zellen vom Typ 1 bzw. 2
Tc-1/ Tc-2	cytotoxische T-Zellen vom Typ 1 bzw. 2
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumornekrosefaktor
zVAD	Caspaseinhibitor, Proteinsequenz: z-Val-Ala-DL-Asp-Fluoromethylketon (FMK)

## 7 LITERATUR

1. Albanese J, Meterissian S, Kontogiannea M, Dubreuil C, Hand A, Sorba S, Dainiak N, (1998). Biologically active Fas antigen and its cognate ligand are expressed on plasma membrane-derived extracellular vesicles. Blood **91** (10): 3862-3874.
2. Albanese J, Dainiak N, (2000). Ionizing radiation alters Fas antigen ligand at the cell surface and on exfoliated plasma membrane-derived vesicles: implications for apoptosis and intercellular signaling. Radiation research **153**: 49-61.
3. Alderson MR, Though TW, Davis-Smith T, Braddy S, Fald B, Schooley KA, Goodwin RG, Smith CA, Ramsdell F, Lynch DH (1995). Fas Ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. J. Exp. Med. **181**: 71-77.
4. Allan SE, Passerini L, Bacchetta R, Crellin N, Dai M, Orban PC, Ziegler SF, Roncarolo MG, Levings MK (2005). The role of 2 FoxP3 isoforms in the generation of human CD4<sup>+</sup> Tregs. J. clin. Invest. **115** (11): 3276-3284.
5. Allison J, Georgiou HM, Strasser A, Vaux DL (1997). Transgenic expression of CD95 ligand on islet beta cells induces a granulocytic infiltration but does not confer immune privilege upon islet allografts. Proc Natl Acad Sci U S A. **94** (8): 3943-3947.
6. Amrolia PJ, Muccioli-Casadei G, Yvon E, Huls H, Sili U, Wieder ED, Bollard C, Michalek J, Ghetie V, Heslop HE, Molldrem JJ, Rooney CM, Schlinder J, Vitetta E, Brenner MK (2003). Selective depletion of donor alloreactive T cells without loss of antiviral or antileukemic responses. Blood **102** (6): 2292-2299.
7. Amrolia PJ, Muccioli-Casadei G, Huls H, Adams S, Durett A, Gee A, Yvon E, Weiss H, Cobbold M, Gaspar HB, Rooney C, Kuehnle I, Ghetie V, Schindler J, Krance R, Heslop HE, Veys P, Vitetta E, Brenner MK (2006). Adoptive immunotherapy with allodepleted donor T-cells improves immune reconstitution after haploidentical stem cell transplantation. Blood **108** (6): 1797-1808
8. Anderson BE, McNiff J, Yan J, Doyle H, Mamula M, Shlomchik MJ, Shlomchik WD (2003). Memory CD4<sup>+</sup> T cells do not induce graft-versus-host disease. J Clin Invest. **112** (1): 101-108.
9. Andre-Schmutz I, Le Deist F, Hacein-Bey-Abina S, Vitetta E, Schindler J, Chedeville G, Vilmer E, Fischer A, Cavazzana-Calvo M (2002). Immune reconstitution without graft-versus-host disease after haemopoietic stem-cell transplantation: a phase 1/2 study. Lancet **360** (9327): 130-137.
10. Aoki K, Kurooka M, Chen JJ, Petryniak J, Nabel EG, Nabel GJ (2001). Extracellular matrix interacts with soluble CD95L: retention and enhancement of cytotoxicity. Nat Immunol. **2** (4): 333-337.
11. Apostolou I, von Boehmer H (2004). In Vivo Instruction of Suppressor Commitment in Naive T Cells. J. Exp. Med. **199**: 1401 - 1408.
12. Apperley JF, Jones L, Hale G, Waldmann H, Hows J, Rombos Y, Tsatalas C, Marcus RE, Goolden AW, Gordon-Smith EC, (1986). Bone marrow

- transplantation for patients with chronic myeloid leukaemia: T-cell depletion with Campath-1 reduces the incidence of graft-versus-host disease but may increase the risk of leukaemic relapse. Bone Marrow Transplant. **1** (1): 53-66.
13. Arai H, Chan SY, Bishop DK, Nabel GJ, (1997). Inhibition of the alloantibody response by CD95 ligand. Nature Med. **3** (8): 843-848.
  14. Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S (1996). Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. J Exp Med. **184**: 387-396
  15. Ashkenazi A, Dixit VM (1998). Death receptors: Signaling and modulation. Science **281**: 1305-1308. Review.
  16. Askenasy N, Yolcu ES, Yaniv I, Shirwan H, (2005). Induction of tolerance using Fas ligand: a double-edged immunomodulator. Blood **105** (4): 1396-1404. Review.
  17. Aversa F, Tabilio A, Terenzi A, Velardi A, Falzetti F, Giannoni C, Iacucci R, Zei T, Martelli MP, Gambelunghe C (1994). Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical "three-loci" incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. Blood. **84** (11): 3948-5395
  18. Aversa F, Martelli MF, (2004). Transplantation of haploidentically mismatched stem cells for the treatment of malignant diseases. Springer Semin Immunopathol. **26**(1-2):155-68. Review.
  19. Bach JF (2003). Regulatory T cells under scrutiny. Nat Rev immunol. **3** (3): 189-198.
  20. Bachar-Lustig E, Rachamim N, Li HW, Lan F, Reisner Y (1995). Megadose of T cell-depleted bone marrow overcomes MHC barriers in sublethally irradiated mice. Nat Med **1**: 1268-1273
  21. Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA (2004). Human CD4+CD25+ regulatory T cells. Semin Immunol. **16** (2): 89-98. Review.
  22. Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler DA (2006). MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. J Immunol. **176** (8): 4622-4631.
  23. Barnes DWH, Corp MJ, Loutit JF, Neal FE, (1956). Treatment of murine leukemia with X-rays and homologous bone marrow. BMJ **2**: 626-27.
  24. Barret AJ, Rezvani K, Solomon S, Dickinson AM, Wang XN, Stark G, Cullup H, Jarvis M, Middleton PG, Chao N, (2003). New developments in allotransplant immunology. Hematology 2003: 350-371.
  25. Bénard A, Ceredig R, Rolink AG (2006). Regulatory T cells control autoimmunity following syngeneic bone marrow transplantation. Eur J Immunol. **36**: 2324-2335
  26. Belkaid Y, Rouse BT (2005). Natural regulatory T cells in infectious disease. Nat immunol. **6** (4): 353-360. Review.

27. Berger C, Blau CA, Clackson T, Riddell SR, Heimfeld S (2003). CD28 costimulation and immunoaffinity-based selection efficiently generate primary gene-modified T cells for adoptive immunotherapy. Blood **101** (2): 476-484.
28. Berger C, Blau CA, Huang ML, Iliucci JD, Dalgarno DC, Gaschet J, Heimfeld S, Clackson T, Riddell SR (2004). Pharmacologically regulated Fas-mediated death of adoptively transferred T cells in a nonhuman primate model. Blood **103** (4): 1261-1269.
29. Bertrand Y, Müller SM, Casanova JL, Morgan G, Fischer A, Friedrich W, (2002). Reticular dysgenesis: HLA non-identical bone marrow transplants in a series of 10 patients. Bone Marrow Transplant. **29** (9):759-762.
30. Bigby M, Wang P, Fierro JF, Sy MS, (1990). Phorbol myristate acetate-induced down-modulation of CD4 is dependent on calmodulin and intracellular calcium. J. Immunol. **144** (8): 3111-3116.
31. Billingham RE, (1966). The biology of graft-versus-host reactions. Harvey Lect. **62**: 21-78.
32. Blair A, Goulden NJ, Libri NA, Oakhill A, Pamphilon DH, (2005). Immunotherapeutic strategies in acute lymphoblastic leukaemia relapsing after stem cell transplantation. Blood Rev. **19** (6):289-300. Review.
33. Blazar BR, Quinones RR, Heinritz KJ, Sevenich EA, Filipovich AH (1985). Comparison of three techniques for the ex vivo elimination of T cells from human bone marrow. Exp Hematol. **13** (2): 123-8.
34. Blazar BR, Taylor PA, Boyer MW, Panoskaltsis-Mortari A, Allison JP, Vallera DA (1997). CD28/B7 interactions are required for sustaining the graft-versus-leukemia effect of delayed post-bone marrow transplantation splenocyte infusion in murine recipients of myeloid or lymphoid leukemia cells. J Immunol. **159** (7): 3460-3473
35. Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, Panther E, Urbani S, Ferrari C, Blum HE, von Weizsacker F, Thimme R (2005). T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection. J Virol. **79** (12): 7860-7867.
36. Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. Cell **85** (6): 803-815.
37. Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S, Servida P, Zappone E, Ruggieri L, Ponzoni M, Rossini S, Mavilio F, Traversari C, Bordignon C (1997). HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. Science **276** (5319): 1719-1724.
38. Bordignon C, Bonini C, Verzeletti S, Nobili N, Maggioni D, Traversari C, Giavazzi R, Servida P, Zappone E, Benazzi E, et al (1995). Transfer of the HSV-tk gene into donor peripheral blood lymphocytes for in vivo modulation of donor anti-tumor immunity after allogeneic bone marrow transplantation. Hum Gene Ther. **6** (6): 813-819.

39. Bossi G, Griffiths GM, (1999). Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. Nature Med. **5** (1): 90-96.
40. Boumedine RS, Roy DC (2005). Elimination of alloreactive T cells using photodynamic therapy. Cytotherapy **7** (2): 134-143. Review.
41. Brown GR, McGuire MJ, Thiele DL (1993). Dipeptidyl peptidase I is enriched in granules of in vitro- and in vivo-activated cytotoxic T lymphocytes. J Immunol. **150** (11): 4733-4742.
42. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepers B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. Nat Genet. **27** (1): 68-73.
43. Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, Yoo NJ, Mahboubi A, Echeverri F, Martin SJ, Force WR, Lynch DH, Ware CF, Green DR (1995). Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. Nature **373** (6513): 441-444
44. Buonocore S, Paulart F, Le Moine A, Braun M, Salmon I, Van Meirvenne S, Thielemans K, Goldman M, Flamand V (2003). Dendritic cells overexpressing CD95 (Fas) ligand elicit vigorous allospecific T-cell responses in vivo. Blood **101** (4): 1469-1476.
45. Cavazzana-Calvo M, Fromont C, Le Deist F, Lusardi M, Coulombel L, Derocq JM, Gerota I, Griscelli C, Fischer A (1990). Specific elimination of alloreactive T cells by an anti-interleukin-2 receptor B chain-specific immunotoxin. Transplantation **50** (1): 1-7.
46. Cavazzana-Calvo M, Stephan JL, Sarnacki S, Chevret S, Fromont C, de Coene C, Le Deist F, Guy-Grand D, Fischer A (1994). Attenuation of graft-versus-host disease and graft rejection by ex vivo immunotoxin elimination of alloreactive T cells in an H-2 haplotype disparate mouse combination. Blood **83** (1): 288-298.
47. Cavazzana-Calvo M, Lagresle C, Hacein-Bey-Abina S, Fischer A, (2005). Gene therapy for severe combined immunodeficiency. Annu Rev Med. **56**: 585-602. Review.
48. Chang CC, Satwani P, Oberfield N, Vlad G, Simpson LL, Cairo MS (2005). Increased induction of allogeneic-specific cord blood CD4+CD25+ regulatory T (Treg) cells: a comparative study of naive and antigenic-specific cord blood Treg cells. Exp Hematol. **33** (12): 1508-1520.
49. Chen A, Liu S, Park D, Kang Y, Zheng G (2007). Depleting intratumoral CD4+CD25+ regulatory T cells via FasL protein transfer enhances the therapeutic efficacy of adoptive T cell transfer. Cancer Res. **67** (3): 1291-1298.
50. Chen BJ, Cui X, Liu C, Chao NJ (2002). Prevention of graft-versus-host disease while preserving graft-versus-leukemia effect after selective depletion of host-reactive T cells by photodynamic cell purging process. Blood **99** (9): 3083-3038.

51. Chen BJ, Cui X, Sempowski GD, Liu C, Chao NJ (2004). Transfer of allogeneic CD62L- memory T cells without graft-versus-host disease. Blood **103** (4): 1534-1541.
52. Chen JJ, Sun Y, Nabel GJ (1998). Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L). Science **282** (5394): 1714-1717.
53. Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD (1994). Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. Science **263** (5154): 1759-1762.
54. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. Cell **81** (4): 505-512.
55. Cleveland JL, Ihle JN, (1995). Contenders in FasL/TNF Death signalling. Cell **81**: 479-482.
56. Ciceri F, Bonini C, Gallo-Stampino C, Bordignon C (2005). Modulation of GvHD by suicide-gene transduced donor T Lymphocytes: clinical applications in mismatched transplantation. Cytotherapy **7** (2): 144-149.
57. Cobbold SP, Adams E, Graca L, Waldmann H (2003). Serial analysis of gene expression provides new insights into regulatory T cells. Semin Immunol. **15** (4): 209-214. Review.
58. Cohen GM (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. Biochem J. **326** ( Pt 1):1-16. Review.
59. Cohen JL, Trenado A, Vasey D, Klatzmann D, Salomon BL (2002). CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. J Exp Med. **196** (3): 401-406.
60. Cohen JL, Salomon BL (2005). Therapeutic potential of CD4+CD25+ regulatory T cells in allogeneic transplantation. Cytotherapy **7** (2): 166-170.
61. Cohen Y, Nagler A, (2004). Umbilical cord blood transplantation - how, when and for whom? Blood Rev. **18** (3):167-79. Review.
62. Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Francalanci M, Angeli R, Mazzinghi B, Santarlasci V, Manetti R, Vanini V, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F (2003). Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. Blood **102** (12) :4107-4114.
63. Curotto de Lafaille MA, Lino AC, Kutchukhidze N, Lafaille JJ (2004). CD25- T cells generate CD25+Foxp3+ regulatory T cells by peripheral expansion. J Immunol. **173** (12): 7259-7268.
64. Davies JK, Koh MB, Lowdell MW (2004). Antiviral immunity and T-regulatory cell function are retained after selective alloreactive T-cell depletion in both the HLA-identical and HLA-mismatched settings. Biol Blood Marrow Transplant. **10** (4): 259-268.
65. DeClerck Y, Draper V, Parkman R (1986). Clonal analysis of murine graft-vs-host disease. II. Leukokines that stimulate fibroblast proliferation and



- collagen synthesis in graft-vs. host disease. J Immunol. **136** (10): 3549-3552.
66. Del-Rey M, Ruiz-Contreras J, Bosque A, Calleja S, Gomez-Rial J, Roldan E, Morales P, Serrano A, Anel A, Paz-Artal E, Allende LM (2006). A homozygous Fas ligand gene mutation in a patient causes a new type of autoimmune lymphoproliferative syndrome. Blood **108** (4): 1306-1312.
  67. Dhein J, Walczak H, Bäumler C, Debatin K-M, Krammer PH, (1995). Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). Nature **373**: 438-441
  68. Di Bartolomeo P, di Girolamo G, Olioso P, Angrilli F, Dragani A, Palka G, Guanciali-Franchi P, Ciancarelli M, Papalinetti G, Fioritoni G, D'Antonio D, Iacone A, Torlontano G, (1992). Allogeneic bone marrow transplantation for Fanconi anemia. Bone Marrow Transplantation **10**: 53-56
  69. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G (2001). Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. J Exp Med. **193** (11): 1303-1310.
  70. Dranitzki Elhalel M, Huang JH, Schmidt W, Rachmilewitz J, Tykocinski ML, (2003). CTLA4•FasL induces alloantigen-specific hyporesponsiveness. J. Immunol. **170**: 5842-5850.
  71. Dreger P, Haferlach T, Eckstein V, Jacobs S, Suttorp M, Löffler H, Müller-Ruchholtz W, Schmitz N (1994). G-CSF-mobilized peripheral blood progenitor cells for allogeneic transplantation: safety, kinetics of mobilization, and composition of the graft. Br J Haematol. **87** (3): 609-613.
  72. Dulat HJ, von Grumbkow C, Baars W, Schöder N, Wonigeit K, Schwinzer R, (2001). Down-regulation of human alloimmune responses by genetically engineered expression of CD95 ligand on stimulatory and target cells. Eur. J. Immunol. **31**: 2217-2226.
  73. Dunnion DJ, Cywinski AL, Tucker VC, Murray AK, Rickinson AB, Coulie P, Browning MJ, (1999). Human antigen-presenting cell/tumour cell hybrids stimulate strong allogeneic responses and present tumour-associated antigens to cytotoxic T cells in vitro. Immunol. **98** (4): 541-550.
  74. Edwards PA, Smith CM, Neville AM, O'Hare MJ, (1982). A human-hybridoma system based on a fast-growing mutant of the ARH-77 plasma cell leukemia-derived line. Eur. J. Immunol. **12** (8): 641-648.
  75. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, Negrin RS (2003). CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. Nat Med. **9** (9): 1144-1150.
  76. Ege M, Jacobsen EM, Pillekamp H, Manfras B, Schulz AS, Debatin KM, Friedrich W, Müller SM. Incomplete prevention of GvHD following infusion of HLA-nonidentical donor T-cells after highly efficient allospecific depletion. *Manuskript in Vorbereitung.*
  77. Evan G, Littlewood T (1998). A matter of life and cell death. Science **281**: 1317-1321.

78. Faria AM, Weiner HL (1999). Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. Adv Immunol. **73**: 153-264. Review.
79. Fehse B, Frerk O, Goldmann M, Bulduk M, Zander AR (2000). Efficient depletion of alloreactive donor T lymphocytes based on expression of two activation-induced antigens (CD25 and CD69). Br J Haematol. **109** (3): 644-651.
80. Ferrara JL, Guillen FJ, van Dijken PJ, Marion A, Murphy GF, Burakoff SJ, (1989). Evidence that large granular lymphocytes of donor origin mediate acute graft-versus-host disease. Transplantation **47**(1): 50-54.
81. Fiedler P, Schaetzlein CE, Eibel H (1998). Technical comments: Constitutive Expression of FasL in Thyrocytes. Science **279**: 2015a
82. Filipovich AH, Vallera DA, Youle RJ, Quinones RR, Neville DM Jr, Kersey JH (1984). Ex-vivo treatment of donor bone marrow with anti-T-cell immunotoxins for prevention of graft-versus-host disease. Lancet **1** (8375): 469-472.
83. Fillatreau S, Sweenie CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM (2002). B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. Nat Immunol. **3** (10): 944-950.
84. Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY, Strober W, Lenardo MJ, Puck JM (1995). Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. Cell **81**(6): 935-946.
85. Flad HD, Genscher U, Dietrich M, Krieger D, Trepel FW, Hochapfel G, Teller W, Fliedner TM (1971). Immunological deficiency syndrome in non-identical twins: maintenance in a gnotobiotic state and attempts at treatment with transplants of bone marrow and foetal thymus. Rev Eur Etud Clin Biol. **16** (4): 328-334.
86. Fliedner TM (1998). The role of blood stem cells in hematopoietic cell renewal. Stem Cells **16** Suppl 1:13-29. Review
87. Mary E. D. Flowers, Pablo M. Parker, Laura J. Johnston, Alice V. B. Matos, Barry Storer, William I. Bensinger, Rainer Storb, Frederick R. Appelbaum, Stephen J. Forman, Karl G. Blume, and Paul J. Martin (2002). Comparison of chronic graft-versus-host disease after transplantation of peripheral blood stem cells versus bone marrow in allogeneic recipients: long-term follow-up of a randomized trial. Blood **100** (2) 415-419
88. Fraser A, Evan G (1996). A License to Kill. Cell **85**: 781-784. Review
89. Friedrich W, Goldmann SF, Vetter U, Fliedner TM, Heymer B, Peter HH, Reisner Y, Kleihauer E (1984). Immunoreconstitution in severe combined immunodeficiency after transplantation of HLA-haploidentical, T-cell-depleted bone marrow. Lancet **1** (8380): 761-764.
90. Friedrich W, Müller SM, (2004). Allogeneic stem cell transplantation for treatment of immunodeficiency. Springer Semin Immunopathol. **26** (1-2): 109-118. Review.

91. Friedrich W, Honig M, Schulz A, Muller SM (2004). Immune reconstitution in congenital disorders after HLA-haploidentical hemopoietic stem cell transplantation. Blood Cells Mol Dis. **33** (3): 291-293.
92. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003). FoxP3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. Nat Immunol. **4** (4): 330-336.
93. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY (2005). Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. Immunity. **22** (3): 329-341.
94. Fontenot JD, Rudensky AY (2005). A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. Nat Immunol. **6** (4): 331-337. Review.
95. Ford CE, Hamerton JL, Barnes DW, Loutit JF (1956). Cytological identification of radiation-chimaeras. Nature **177** (4506): 452-454.
96. Ford CE, Micklem HS, Ogden DA, (1968). Evidence for the existence of a lymphoid stem cell. Lancet **1** (7543): 621-2.
97. Fowler DH, Kurasawa K, Smith R, Eckhaus MA, Gress RE (1994). Donor CD4-enriched cells of Th2 cytokine phenotype regulate graft-versus-host disease without impairing allogeneic engraftment in sublethally irradiated mice. Blood **84** (10): 3540-3549.
98. Fowler DH, Breglie J, Nagel G, Eckhaus MA, Gress RE (1996). Allospecific CD8<sup>+</sup> Tc1 and Tc2 populations in graft-versus-leukemia effect and graft-versus-host disease. J Immunol. **157**: 4811-4821.
99. Furtado GC, Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Lafaille JJ (2002). Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. J Exp Med. **196** (6): 851-857.
100. Garin MI, Garrett E, Tiberghien P, Apperley JF, Chalmers D, Melo JV, Ferrand C (2001). Molecular mechanism for ganciclovir resistance in human T lymphocytes transduced with retroviral vectors carrying the herpes simplex virus thymidine kinase gene. Blood **97** (1): 122-129.
101. Garderet L, Snell V, Przepiorka D, Schenk T, Lu LG, Marini F, Gluckman E, Andreeff M, Champlin RE, (1999). Effective depletion of alloreactive lymphocytes from peripheral blood mononuclear cell preparations. Transplantation **67** (1): 124-130.
102. Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA, (1968). Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. Lancet **2** (7583): 1366-1369.
103. Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, deRoos P, Ho WY, Stray-Pedersen A, Ocheltree EL, Greenberg PD, Ochs HD, Rudensky AY (2006). Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. Proc Natl Acad Sci USA. **103** (17): 6659–6664.

104. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, Rudensky AY (2007). Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. Nature **445** (7129): 771-775
105. Georgantas RW 3rd, Leong KW, August JT (2000). Antigen-specific induction of peripheral T cell tolerance in vivo by codelivery of DNA vectors encoding antigen and Fas ligand. Hum Gene Ther. **11** (6): 851-858.
106. Georgantas RW 3rd, Bohana-Kashtan O, Civin CI (2006). Ex vivo soluble fas ligand treatment of donor cells to selectively reduce murine acute graft versus host disease. Transplantation **82** (4): 471-478.
107. Gershon R, Kondo K (1971). Infectious immunological tolerance. Immunology **21**: 903-914.
108. Gluckman E, Browmeyer HE, Auerbach AD, (1989). Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from a HLA-identical sibling. N Engl J Med **321**: 1174-1178
109. Gluckman E, (1996) Bone marrow transplantation in children with hereditary disorders. Curr Opin Pediatr. **8** (1): 42-44. Review.
110. Gluckman E, Rocha V, (2004). Cord blood transplant: strategy of alternative donor search. Springer Semin Immunopathol. **26** (1-2): 143-54. Review.
111. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, Lerner KG, Thomas ED, (1974). Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. Transplantation **18** (4): 295-304.
112. Godfrey WR, Krampf MR, Taylor PA, Blazar BR (2004-1). Ex vivo depletion of alloreactive cells based on CFSE dye dilution, activation antigen selection, and dendritic cell stimulation. Blood **103** (3): 1158-1165.
113. Godfrey WR, Ge YG, Spoden DJ, Levine BL, June CH, Blazar BR, Porter SB (2004-2). In vitro-expanded human CD4(+)CD25(+) T-regulatory cells can markedly inhibit allogeneic dendritic cell-stimulated MLR cultures. Blood **104** (2): 453-461.
114. Golshayan D, Jiang S, Tsang J, Garin MI, Mottet C, Lechler RI (2007). In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance. Blood **109**: 827-835.
115. Golstein P (1997). Controlling cell death. Science **275** (5303): 1081-1082. Review.
116. Goulmy E, Schipper R, Pool J, Blokland E, Falkenburg JH, Vossen J, Gratwohl A, Vogelsang GB, van Houwelingen HC, van Rood JJ, (1996). Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. N. Engl. J. Med. **334**: 281-285.
117. Graca L (2005). New tools to identify regulatory T-cells. Eur J Immunol. **35**: 1678-1680.

118. Green DR, Ware CF (1997). Fas-ligand: Privilege and peril. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 5986-5990.
119. Green DR, Reed, JC (1998). Mitochondria and apoptosis. Science **281**: 1309-1312. Review.
120. Griffith TS, Ferguson TA (1997). The role of FasL-induced apoptosis in immune privilege. Immunol Today. 18 (5): 240-244.
121. Guimond M, Balassy A, Barrette M, Brochu S, Perreault C, Roy DC (2002). P-glycoprotein targeting: a unique strategy to selectively eliminate immunoreactive T cells. Blood **100** (2): 375-382.
122. Guinan EC, Boussiotis VA, Neuberg D, Brennan LL, Hirano N, Nadler LM, Gribben JG (1999). Transplantation of anergic histoincompatible bone marrow allografts. N Engl J Med. 340 (22): 1704-1714.
123. Haddad E, Landais P, Friedrich W, Gerritsen B, Cavazzana-Calvo M, Morgan G, Bertrand Y, Fasth A, Porta F, Cant A, Espanol T, Muller S, Veys P, Vossen J, Fischer A, (1998). Long-term immune reconstitution and outcome after HLA-nonidentical T-cell-depleted bone marrow transplantation for severe combined immunodeficiency: a European retrospective study of 116 patients. Blood **91** (10): 3646-3653.
124. Hahne M, Renno T, Schroeter M, Irmeler M, French L, Bornard T, MacDonald HR, Tschopp J, (1996). Activated B cells express functional Fas ligand. Eur J Immunol. **26** (3): 721-724.
125. Hale G, Bright S, Chumbley G, Hoang T, Metcalf D, Munro AJ, Waldmann H (1983). Removal of T cells from bone marrow for transplantation: a monoclonal antilymphocyte antibody that fixes human complement. Blood **62** (4): 873-882.
126. Hale G, Waldmann H, (1998). Risks of developing Epstein-Barr virus-related lymphoproliferative disorders after T-cell-depleted marrow transplants. CAMPATH Users. Blood **91** (8): 3079-3083.
127. Handgretinger R, Klingebiel T, Lang P, Schumm M, Neu S, Geiselhart A, Bader P, Schlegel PG, Greil J, Stachel D, Herzog RJ, Niethammer D, (2001). Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34(+) progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. Bone Marrow Transplant. **27** (8): 777-783.
128. Hansen M, Schaeffer A, Tseng-Law J, Bender J, Van Epps D, Luqman M, (2001). Bone marrow transplants from unrelated donors for patients with chronic myeloid leukemia. N. Engl. J. Med. **338**: 962
129. Harada M, Nagafuji K, Fujisaki T, Kubota A, Mizuno S, Takenaka K, Miyamoto T, Ohno Y, Gondo H, Kuroiwa M, Okamura T, Inaba S, Niho Y, (1996). G-CSF-induced mobilization of peripheral blood stem cells from healthy adults for allogeneic transplantation. J Hematother. **5** (1):63-71
130. Hartwig U, Robbers M, Wickenhauser, C, Huber C, (2002). Murine acute graft-versus-host disease can be prevented by depletion of alloreactive T lymphocytes using activation-induced cell death. Blood **99** (8): 3041-3949.

131. Hartwig UF, Nonn M, Khan S, Meyer RG, Huber C, Herr W (2006). Depletion of alloreactive T cells via CD69: implications on antiviral, antileukemic and immunoregulatory T lymphocytes. Bone Marrow Transplant. **37** (3) :297-305.
132. Hauben E, Bacchetta R, Roncarolo MG (2005). Utilizing regulatory T cells to control alloreactivity. Cytotherapy **7** (2): 158-165.
133. Hayashi Y, Tsukumo S, Shiota H, Kishihara K, Yasutomo K (2004). Antigen-specific T cell repertoire modification of CD4+CD25+ regulatory T cells. J Immunol. **172**: 5240-5248.
134. Hengartner MO, (2000). The biochemistry of apoptosis. Nature **407** (6805): 770-776. Review.
135. Heslop HE, Brenner MK, Rooney CM, (1994). Donor T cells to treat EBV-associated lymphoma. N. Engl. J. Med. **331**: 679
136. Hildemann WH, Rathbun WE, Walford RL (1967). Early manifestations of acute transplantation (allogeneic) disease in mice. Transplantation **5** (3): 504-513.
137. Ho VT, Soiffer RJ (2001). The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Blood **98** (12): 3192-3204. Review
138. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S (2002). Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. J Exp Med. **196** (3): 389-399.
139. Hoffmann P, Eder R, Kunz-Schughart LA, Andreesen R, Edinger (2004). Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25high regulatory T cells. Blood **104** (3): 895-903
140. Hoffmann P und Edinger M (2006). CD4+CD25+ Regulatory T Cells and Graft-Versus-Host Disease. Semin Hematol. **43**: 62-69
141. Hohlbaum AM, Moe S, Marshak-Rothstein A (2000). Opposing effects of transmembrane and soluble Fas ligand expression on inflammation and tumor cell survival. J Exp Med. **191** (7): 1209-1220.
142. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science **299** (5609): 1057-1061.
143. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, Rozman C, Speck B, (1990). Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. Blood **75**: 555
144. Hoves S, Krause SW, Halbritter D, Zhang HG, Mountz JD, Schölmerich J, Fleck M, (2003). Mature but not immature Fas Ligand (CD95L)-transduced human monocyte-derived dendritic cells are protected from Fas-mediated apoptosis and can be used as killer APC. J. Immunol. **170**: 5406-5413.

145. Hoves S, Krause SW, Herfarth H, Halbritter D, Zhang HG, Mountz JD, Schölmerich J, Fleck M (2004). Elimination of activated but not resting primary human CD4+ and CD8+ T cells by Fas ligand (FasL/CD95L)-expressing killer-dendritic cells. Immunobiol. **208**: 463-475.
146. Huang JH, Tykocinski ML, (2001). CTLA-4-Fas ligand functions as a trans signal converter protein in bridging antigen-presenting cells and T cells. Int. Immunol. **13**: 529-536.
147. Hunt JS, Vassmer D, Ferguson TA, Miller L (1997). Fas ligand is positioned in mouse uterus and placenta to prevent trafficking of activated leukocytes between the mother and the conceptus. J Immunol. **158** (9): 4122-4128.
148. Ichim TE, Zhong R, Min WP (2003). Prevention of allograft rejection by in vitro generated tolerogenic dendritic cells. Transpl Immunol. **11** (3-4): 295-306. Review.
149. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. Cell **66** (2): 233-243.
150. Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, Sakaguchi S (1999). Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. J Immunol. **162** (9): 5317-5326.
151. Jackson CE, Fischer RE, Hsu AP, Anderson SM, Choi Y, Wang J, Dale JK, Fleisher TA, Middleton LA, Sneller MC, Lenardo MJ, Straus SE, Puck JM (1999). Autoimmune lymphoproliferative syndrome with defective Fas: genotype influences penetrance. Am J Hum Genet. **64** (4): 1002-1014.
152. Jaime-Perez JC, Ruiz-Arguelles GJ, Gomez-Almaguer D, (2005). Haematopoietic stem cell transplantation to treat aplastic anaemia. Expert Opin Biol Ther. **5** (5): 617-26. Review.
153. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ, (2005). Immunobiology. The immune system in health and disease. 6. Auflage Garland Science Publishing.
154. Jarvis LB, Matyszak MK, Duggleby RC, Goodall JC, Hall FC, Gaston JS (2005). Autoreactive human peripheral blood CD8+ T cells with a regulatory phenotype and function. Eur J Immunol. **35**: 2896-2908.
155. Joffre O, Gorsse N, Romagnoli P, Hudrisier D, van Meerwijk JP (2004). Induction of antigen-specific tolerance to bone marrow allografts with CD4+CD25+ T lymphocytes. Blood **103** (11): 4216-4221.
156. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH (2001). Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. J Exp Med. **193** (11): 1285-1294.

157. Ju ST, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, el-Khatib M, Sherr DH, Stanger BZ, Marshak-Rothstein A (1995). Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* **373** (6513): 444-448.
158. Juo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J (1998). Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol.* **8** (18): 1001-1008.
159. Juttner CA, To LB, Haylock DN, Dyson PG, Bradstock KF, Dale BM, Enno A, Sage RE, Szer J, Toogood IR (1990). Approaches to blood stem cell mobilisation. Initial Australian clinical results. *Bone Marrow Transplant.* **5** Suppl 1: 22-24.
160. Kabelitz D, Pohl T, Pechhold K (1993). Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes. *Immunol Today.* **14** (7): 338-339. Review.
161. Kametaka M, Kume A, Okada T, Mizukami H, Hanazono Y, Ozawa K (2003). Reduction of CTLL-2 cytotoxicity by induction of apoptosis with a Fas-estrogen receptor chimera. *Cancer Sci.* **94** (7): 639-643.
162. Kang SM, Schneider DB, Lin Z, Hanahan D, Dichek DA, Stock PG, Baekkeskov S (1997). Fas ligand expression in islets of Langerhans does not confer immune privilege and instead targets them for rapid destruction. *Nat Med.* **3** (7): 738-743.
163. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F (2003). An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol.* **4** (4): 337-342.
164. Kawakami M, Nakata J, Ohguro N, Yoshihara S, Inoue T, Tatekawa T, Ikegame K, Oka Y, Kawase I, Ogawa H, (2005). A case of immune recovery vitritis induced by donor leukocyte infusion for the treatment of cytomegalovirus retinitis. *Eur J Haematol.* **75** (4): 352-354.
165. Kayagaki N, Kawasaki A, Ebata T, Ohmoto H, Ikeda S, Inoue S, Yoshino K, Okumura K, Yagita H, (1995). Metalloproteinase-mediated release of human Fas Ligand. *J. Exp. Med.* **182**: 1777-1783.
166. Kernan NA, Bartsch g, Ash RC, Beatty, PG, Champlin R, Filipovich A, Gajewski J, Hansen JA, Henslee-Downey J, McCullough J, (1993). Analysis of 462 transplantations from unrelated donors facilitated by the National Marrow Donor Program. *N. Engl. J. Med.* **328**: 593.
167. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* **26** (4): 239-257. Review.
168. Kilshaw P, Brent L, Pinto M (1975). Suppressor T cells in mice made unresponsive to skin allografts. *Nature* **255**: 489-491.
169. Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY (2007). Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat. Immunol.* **8** (2): 191-197.



170. Kinter AL, Hennessey M, Bell A, Kern S, Lin Y, Daucher M et al. (2004). CD25(+)CD4(+) regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4(+) and CD8(+) HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status. J Exp Med. **200**: 331-343.
171. Klas C, Debatin K-M, Jonker RR, Krammer PH, (1993). Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. Int. Immunol. **5** (6): 625-630.
172. Knobloch C, Spadinger U, Rueber E, Friedrich W. T cell depletion from human bone marrow using magnetic beads (1990). Bone Marrow Transplant. **6** (1): 21-24.
173. Koenen HJPM, Joosten I (2006). Antigen-specific regulatory T-cell subsets in transplantation tolerance. Regulatory T-cell subset quality reduces the need for quantity. Human Immunol. **67**: 665-675.
174. Körbling M, Flidner TM, Pflieger H (1980). Collection of large quantities of granulocyte/macrophage progenitor cells (CFUc) in man by means of continuous-flow leukapheresis. Scand J Haematol. **24** (1): 22-28.
175. Körbling M, Przepiorka D, Huh YO, Engel H, van Besien K, Giralt S, Andersson B, Kleine HD, Seong D, Deisseroth AB, et al., (1995a). Allogeneic blood stem cell transplantation for refractory leukemia and lymphoma: potential advantage of blood over marrow allografts. Blood **85** (6): 1659-65
176. Körbling M, Huh YO, Durett A, Mirza N, Miller P, Engel H, Anderlini P, van Besien K, Andreeff M, Przepiorka D, Deisseroth AB, Champlin RE (1995b). Allogeneic blood stem cell transplantation: peripheralization and yield of donor-derived primitive hematopoietic progenitor cells (CD34+ Thy-1dim) and lymphoid subsets, and possible predictors of engraftment and graft-versus-host disease. Blood **86** (7): 2842-2848.
177. Körbling M, Anderlini P, (2001). Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter? Blood **98** (10): 2900-2908. Review.
178. Koh MB, Prentice HG, Lowdell MW (1999). Selective removal of alloreactive cells from haematopoietic stem cell grafts: graft engineering for GVHD prophylaxis. Bone Marrow Transplant. **23** (10): 1071-1079.
179. Koh MB, Prentice HG, Corbo M, Morgan M, Cotter FE, Lowdell MW (2002). Alloantigen-specific T-cell depletion in a major histocompatibility complex fully mismatched murine model provides effective graft-versus-host disease prophylaxis in the presence of lymphoid engraftment. Br J Haematol. **118** (1): 108-116.
180. Kohm AP, McMahon JS, Podojil JR, Begolka WS, DeGutes M, Kasprowicz DJ, Ziegler SF, Miller SD (2006). Cutting Edge: Anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells. J Immunol. **176** (6):3301-3305.

181. Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, Heim M, Wilmanns W (1990). Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. Blood **76** (12):2462-5.
182. Kosiewicz MM, Krishnan A, Worthington MT, Matriano JA, Ross WG, (2002). B cells engineered to express Fas ligand suppress pre-sensitized antigen-specific T cell responses in vivo. Eur J Immunol. Jun;32(6):1679-87.
183. Krammer PH, (1999). (Apo-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. Adv Immunol. **71**: 163-210.
184. Krammer PH, (2000). Apoptose. Deutsches Ärzteblatt **97** (25): A-1752-1759. Review.
185. Kretschmer K, Apostolou I, Jaeckel E, Khazaie K, von Boehmer H (2006). Making regulatory T cells with defined antigen specificity: role in autoimmunity and cancer. Immunol Rev. **212**: 163-169. Review.
186. Kreijveld E, Koenen HJ, Klasen IS, Hilbrands LB, Joosten I (2007). Following anti-CD25 treatment, a functional CD4+CD25+ regulatory T-cell pool is present in renal transplant recipients. Am J Transplant. **7** (1):249-255
187. Krüger A, Fas SC, Baumann S, Krammer PH, (2003). The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. Immunol Rev. **193**: 58-69.
188. Kuby J. Immunology. 2. Auflage 1994. WH Freeman und Company, NY
189. Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, Smith C, Olson JF, Halperin EC, Ciocchi G, Carrier C, Stevens CE, Rubinstein P (1996). Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. N Engl J Med. **335**: 157-166.
190. Lahl K, Loddenkemper C, Drouin C, Freyer J, Arnason J, Eberl G, Hamann A, Wagner H, Huehn J, Sparwasser T (2007). Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. J Exp Med. **204** (1): 57-63.
191. Lane TA, Law P, Maruyama M, Young D, Burgess J, Mullen M, Mealiffe M, Terstappen LW, Hardwick A, Moubayed M (1995). Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilized into the peripheral blood of normal donors by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or G-CSF: potential role in allogeneic marrow transplantation. Blood. **85** (1):275-282.
192. Lau HT, Yu M, Fontana A, Stöckert CJ, (1996). Prevention of Islet allograft rejection with engineered myoblasts expressing FasL in mice. Science **273**: 109-112.
193. Le NT, Chen BJ, Chao NJ (2005). Selective elimination of alloreactivity from immunotherapeutic T cells by photodynamic cell purging and memory T-cell sorting. Cytotherapy **7** (2): 126-133. Review.

194. Leisenring WM, Martin PJ, Petersdorf EW, Regan AE, Aboulhosn N, Stern JM, Aker SN, Salazar RC, McDonald GB (2006). An acute graft-versus-host disease activity index to predict survival after hematopoietic cell transplantation with myeloablative conditioning regimens. Blood. **108** (2): 749-755.
195. Lenardo M, Chan KM, Hornung F, McFarland H, Siegel R, Wang J, Zheng L (1999). Mature T lymphocyte apoptosis - immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. Annu Rev Immunol. **17**: 221-253. Review.
196. Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG (2001). Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. J Exp Med. **193** (11):1295-1302.
197. Li Y, Li XC, Zheng XX, Wells AD, Turka LA, Strom TB, (1999). Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. Nat. Med. **5**: 1298-1304.
198. Liang S, Alard P, Zhao Y, Parnell S, Clark SL, Kosiewicz MM, (2005). Conversion of CD4+CD25- cells into CD4+CD25+ regulatory T cells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus. J. Exp. Med. **201**:127-137.
199. Litzinger MT, Fernando R, Curiel TJ, Grosenbach DW, Schlom J, Palena C (2007). IL-2 immunotoxin denileukin diftiox reduces regulatory T cells and enhances vaccine-mediated T-cell immunity. Blood. **110** (9): 3192-3201
200. Link H, Arseniev L, Bahre O, Kadar JG, Diedrich H, Poliwoda H (1996). Transplantation of allogeneic CD34+ blood cells. Blood **87** (11): 4903-4909.
201. Lohrmann HP, Dietrich M, Goldmann SF, Kristensen T, Flidner TM, Abt C, Pflieger H, Flad HD, Kubanek B, Heimpel H (1975). Bone marrow transplantation for aplastic anaemia from a HLA and MLC-identical unrelated donor. Blut **31** (6): 347-354.
202. Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E, (1951). Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. J Natl Cancer Inst. **12** (1): 197-201.
203. Lu L, Qian S, Hershberger P, Rudert WA, Lynch DH, Thomson AW, (1997). Fas Ligand (CD95L) and B7 expression on dendritic cells provide counter-regulatory signals for T cell survival and proliferation. J. Immunol. **158**: 5676-5684.
204. Lucarelli G, Polchi P, Izzi T, Manna M, Agostinelli F, Delfini C, Porcellini A, Galimberti M, Moretti L, Manna A, (1997). Bone marrow transplantation in thalassemia. Cancer Treat. Res. **77**: 305

205. Lynch DH, Ramsdell F, Alderson MR (1995). Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. Immunol Today. **16** (12): 569-574. Review.
206. Mackall CL, Gress RE (1997). Pathways of T-cell regeneration in mice and humans: implications for bone marrow transplantation and immunotherapy. Immunol Rev. **157**: 61-72.
207. Martin PJ, Hansen JA, Buckner CD, Sanders JE, Deeg HJ, Stewart P, Appelbaum FR, Clift R, Fefer A, Witherspoon RP, (1985). Effects of in vitro depletion of T cells in HLA-identical allogeneic marrow grafts. Blood **66** (3): 664-672.
208. Martins SL, St John LS, Champlin RE, Wieder ED, McMannis J, Molldrem JJ, Komanduri KV (2004). Functional assessment and specific depletion of alloreactive human T cells using flow cytometry. Blood **104** (12): 3429-3436.
209. Martínez-Lorenzo MJ, Alava MA, Anel A, Pineiro A, Naval J, (1996). Release of preformed Fas ligand in soluble form is the major factor for activation-induced death of Jurkat T cells. Immunology **89**: 511-517.
210. Martínez-Lorenzo MJ, Anel A, Gamen S, Monleón I, Lasierra P, Larrad L, Pineiro A, Alava MA, Naval J, (1999). Activated human T cells release bioactive Fas Ligand and APO2 Ligand in microvesicles. J. Immunol. **163**: 1274-1281.
211. Martinic MM, von Herrath MG (2006). Control of graft-versus-host disease by regulatory T cells: Which level of antigen specificity. Eur J Immunol. **36**: 2299-2303.
212. Mathe G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattani A, Schneider M, (1967). Treatment of acute leukemia by allogeneic bone marrow. Prog Clin Cancer. **3**:309-19.
213. Matsue H, Matsue K, Walters M, Okumura K, Yagita H, Takashima A, (1999). Induction of antigen-specific immunosuppression by CD95L cDNA-transfected „killer“ dendritic cells. Nature Med **5** (8): 930-937.
214. Matsue H, Matsue K, Kusuvara M, Kumamoto K, Yagita H, Takashima A, (2001). Immunosuppressive properties of CD95L-transduced „killer“ hybrids created by fusing donor- and recipient-derived dendritic cells. Blood **98**: 3465-3472.
215. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, Byrne MC (2002). CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNFreceptor. Immunity. **16** (2): 311-323.
216. McLeod JD, Walker LS, Patel YI, Boulougouris G, Samsom DM, (1998). Activation of human T-cells with superantigen (staphylococcal enterotoxin B) and CD28 confers resistance to apoptosis via CD95. J. Immunol. **160** (5):2072-2079.

217. McNeill A, Spittle E, Backstrom BT (2007) Partial depletion of CD69<sup>low</sup>-expressing natural regulatory T cells with the anti-CD25 monoclonal antibody PC61. Scand J Immunol. **65** (1):63-69.
218. Michalek J, Collins RH, Durrani HP, Vaclavkova P, Ruff LE, Douek DC, Vitetta ES, (2003). Definitive separation of graft-versus-leukemia- and graft-versus-host-specific CD4<sup>+</sup> T cells by virtue of their receptor beta loci sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. **100**: 1180-1184
219. Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). EMBO J. **16** (10): 2794-2804.
220. Min W, Gorczynski R, Huang X-Y, Kushida M, Kim P, Obataki M, Lei J, Suri RM, Catral MS, (2000). Dendritic cells genetically engineered to express Fas Ligand induce donor-specific hyporesponsiveness and prolong allograft survival. J. Immunol. **164**: 161-167.
221. Miyawaki T, Uehara T, Nibu R, Tsuji T, Yachi A, Yonehara S, Taniguchi N, (1992). Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. J. Immunol. **149**: 3753-3758.
222. Miwa K, Hashimoto H, Yatomi T, Nakamura N, Nagata, S, Suda T, (1999). Therapeutic effect of an anti-Fas ligand mAb on lethal graft-versus-host disease. Int. Immunol. **11** (6): 925-931.
223. Mohamood AS, Trujillo CJ, Zheng D, Jie C, Murillo FM, Schneck JP, Hamad AR (2006). Gld mutation of Fas ligand increases the frequency and up-regulates cell survival genes in CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> TR cells. Int Immunol. **18** (8): 1265-1277.
224. Montagna D, Yvon E, Calcaterra V, Comoli P, Locatelli F, Maccario R, Fisher A, Cavazzana-Calvo M (1999). Depletion of alloreactive T cells by a specific anti-interleukin-2 receptor p55 chain immunotoxin does not impair in vitro antileukemia and antiviral activity. Blood **93**(10): 3550-3557.
225. Morgan ME, van Bilsen JHM, Bakker AM, Heemskerk B, Schilham MW, Hartgers FC, Elfering BG, van der Zanden L, de Vries RRP, Huizinga TWJ, Ottenhoff THM, Toes REM (2005). Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells in humans. Human Immunology **66**: 13-20.
226. Moss P, Rickinson A (2005). Cellular immunotherapy for viral infection after HSC transplantation. Nature Rev Immunol. **5**: 9-20. Review.
227. Müller S, Schulz A, Reiss U, Schwarz K, Schreiner T, Wiesneth M, Debatin KM, Friedrich W, (1999). Definition of a critical T cell threshold for prevention of GVHD after HLA non-identical PBPC transplantation in children. Bone Marrow Transplant. **24** ( 6): 575-581.
228. Müller SM, Kohn, T, Schulz AS, Debatin KM, Friedrich W, (2000). Similar pattern of thymic-dependent T-cell reconstitution in infants with severe combined immunodeficiency after human leukocyte antigen (HLA)-identical and HLA-nonidentical stem cell transplantation. Blood **96**: 4344-4349.

229. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. Cell **85** (6): 817-827.
230. Nagata S, Golstein P (1995). The Fas death factor. Science. **267** (5203): 1449-1456. Review.
231. Nagata S, Suda T (1995). Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. Immunol Today. **16** (1): 39-43. Review.
232. Nagata S (1997). Apoptosis by death factor. Cell **88** (3): 355-365. Review.
233. Newell MK, Desbarats J (1999). Fas ligand: receptor or ligand? Apoptosis **4** (5): 311-315.
234. Ng WF, Duggan PJ, Ponchel F, Matarese G, Lombardi G, Edwards AD, Isaacs JD, Lechler RI (2001). Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. Blood **98** (9): 2736-2744.
235. Nishikawa M, Huang L, (2001). Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. Hum. Gene. Ther. **12** (8): 827-828
236. Nishimura E, Sakihama T, Setoguchi R, Tanaka K, Sakaguchi S (2004). Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. Int Immunol. **16** (8): 1189-1201.
237. O'Flaherty E, Ali S, Pettit SJ, Kirby JA, (1998). Examination of the sensitivity of T cells to Fas ligation. Transplant. **66**: 1067-1073.
238. Olkinuora H, Talvensaari K, Kaartinen T, Siitonen S, Saarinen-Pihkala U, Partanen J, Vetteranta K (2007). T cell regeneration in pediatric allogeneic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant. **39**: 149-156.
239. O'Reilly RJ, Friedrich W, Small TN, (1994). Transplantation approaches for severe combined immunodeficiency disease, Wiskott-Aldrich Syndrome and other lethal genetic, combined immunodeficiency disorders. In: Forman SJ, BlumeKG, Thomas ED: Bone marrow Transplantation. Blackwell Scientific Publications, Boston: 849-873
240. Or R, Aker M, Shapira MY, Resnick I, Bitan M, Samuel S, Slavin S, (2004). Allogeneic stem cell transplantation for the treatment of diseases associated with a deficiency in bone marrow products. Springer Semin Immunopathol. **26** (1-2):133-142. Review.
241. Orentas RJ, Kohler ME, Johnson BD (2006). Suppression of anti-cancer immunity by regulatory T cells: back to the future. Semin Cancer Biol. **16** (2): 137-149. Review.
242. Ottonello L, Tortolina G, Amelotti M, Dallegri F (1999). Soluble Fas ligand is chemotactic for human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. J Immunol. **162** (6): 3601-3606.

243. Oudrhiri N, Farcet JP, Goudrin MF, Divine M, Bouguet J, Fradelizi D, Reyes F, (1985). Mechanism of accessory cell requirement in inducing IL2 responsiveness by human T4 lymphocytes that generate colonies under PHA stimulation. J.Immunol. **135** (3): 1813-1818.
244. Owen-Schaub LB, Yonehara S, Crump WL 3rd, Grimm EA (1992). DNA fragmentation and cell death is selectively triggered in activated human lymphocytes by Fas antigen engagement. Cell Immunol. **140** (1): 197-205.
245. Papadopoulos, EB, Ladanyi M, Emanuel D, MacKinnon S, Boulad F, Carabasi, Castro-Malaspina MHH, Childs BH, Gillio A Small TN, (1994). Infusions of donor leukocytes to treat Eppstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. N Engl J Med **330**: 1185.
246. Papoff G, Stassi G, De Maria R (1998). Technical comments: Constitutive Expression of FasL in Thyrocytes (Answer). Science **279**: 2015a
247. Perruccio K, Topini F, Tosti A, Carotti A, Aloisi T, Aversa F, Martelli MF, Velardi A (2008). Photodynamic purging of alloreactive T cells for adoptive immunotherapy after haploidentical stem cell transplantation. Blood Cells Mol Dis. **40** (1): 76-83.
248. Pilarski LM, Paine D, McElhaney JE, Cass CE, Belch AR (1995). Multidrug transporter P-glycoprotein 170 as a differentiation antigen on normal human lymphocytes and thymocytes: modulation with differentiation stage and during aging. Am J Hematol. **49** (4): 323-335.
249. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, Thomas ED, (1995). 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. Bone Marrow Transplant. **15** (6): 825-828. Review.
250. Raff M (1998) Dell suicide for beginners. Nature **396**: 119-122. Review.
251. Raphael RI (2005) Pathophysiology and treatment of sickle cell disease. Clin Adv Hematol Oncol. **3** (6): 492-505. Review.
252. Reisner Y, Ikehara S, Hodes MZ, Good RA (1980). Allogeneic hemopoietic stem cell transplantation using mouse spleen cells fractionated by lectins: in vitro study of cell fractions. Proc Natl Acad Sci USA. **77** (2):1164-8.
253. Reisner Y, Kapoor N, Kirkpatrick D, Pollack MS, Cunningham-Rundles S, Dupont B, Hodes MZ, Good RA, O'Reilly RJ (1983). Transplantation for severe combined immunodeficiency with HLA-A,B,D,DR incompatible parental marrow cells fractionated by soybean agglutinin and sheep red blood cells. Blood **61** (2): 341-8.
254. Reisner Y, Martelli MF (2000). Tolerance induction by „megadose“ transplants of CD34+ stem cells: a new option for leukemia patients without an HLA-matched donor. Curr Opin Immunol. **12**: 536-541.
255. Rencher SD, Houston JA, Lockey TD, Hurwitz JL (1996). Eliminating graft-versus-host potential from T cell immunotherapeutic populations. Bone Marrow Transplant. **18** (2): 415-420.

256. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IA, Debatin KM, Fischer A, de Villartay JP (1995). Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. Science **268** (5215): 1347-1349.
257. Robinet E, Fehse B, Ebeling S, Sauce D, Ferrand C, Tiberghien P (2005). Improving the ex vivo retroviral-mediated suicide-gene transfer process in T lymphocytes to preserve immune function. Cytotherapy **7** (2): 150-7. Review.
258. Roncarolo MG, Levings MK (2000). The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. Curr Opin Immunol. **12** (6): 676-683. Review.
259. Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK (2001). Type 1 T regulatory cells. Immunol Rev. **182**: 68-79. Review.
260. Rooney CM, Smith CA, Ng CY, Loftin S, Li C, Krance RA, Brenner MK, Heslop HE (1995). Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. Lancet **345**: 9-13
261. Rosenfeld CS, Thiele DL, Shadduck RK, Zeigler ZR, Schindler J (1995). Ex vivo purging of allogeneic marrow with L-Leucyl-L-leucine methyl ester. A phase I study. Transplantation **60** (7): 678-683.
262. Roy DC, Cohen S, Busque L, Fish D, Kiss T, Lachance S, Sauvageau G, Caudrelier P, Roy J (2007). Haplotype Mismatched Myeloablative Stem Cell Transplantation: Phase I Clinical Trial of Donor Lymphocyte Infusion Depleted of Alloreactive T Cells To Limit Infections and Malignant Relapse without Causing GVHD. Meeting report Keystone, BMT Tandem meetings 2007
263. Rubin LA, Kurman CC, Fritz ME, Biddison WE, Boutin B, Yarchoan R, Nelson DL, (1985). Soluble interleukin 2 receptors are released from activated human lymphoid cells in vitro. J Immunol. **135** (5):3172-3177.
264. Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, Kurtzberg J, Adamson J, Migliaccio AR, Berkowitz RL, Cabbad M, Dobrila NL, Taylor PE, Rosenfield RE, Stevens CE (1998). Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. N Engl J Med **339**: 1565-1577.
265. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol. **155** (3): 1151-1164.
266. Sakaguchi S (2000). Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. Cell **101** (5): 455-458. Review.
267. Sakaguchi S (2005). Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. Nat Immunol. **6** (4): 345-352.



268. Salomon BL, Sudres M, Cohen JL, (2006). Regulatory T cells in graft-versus-host disease. Springer Semin Immunopathol. **28** (1): 25-29.
269. Sambrook *et al.* 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual.
270. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. EMBO J. **17** (6): 1675-1687.
271. Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A, Tschopp J. (1998). Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. J Exp Med. **187** (8): 1205-1213.
272. Schulz AS, Classen CF, Mihatsch WA, Sigl-Kraetzig M, Wiesneth M, Debatin KM, Friedrich W, Müller SM, (2002). HLA-haploidentical blood progenitor cell transplantation in osteopetrosis. Blood 99(9):3458-3460.
273. Seddiki N, Santner-Nanan B, Tangye SG, Alexander SI, Solomon M, Lee S, Nanan R, de Saint Groth BF (2006). Persistence of naive CD45RA+ regulatory T cells in adult life. Blood. **107**: 2830-2838.
274. Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S (2005). Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. J Exp Med. **201** (5): 723-735.
275. Seino K, Iwabuchi K, Kayagaki N, Miyata R, Nagaoka I, Matsuzawa A, Fukao K, Yagita H, Okumura K (1998). Chemotactic activity of soluble Fas ligand against phagocytes. J Immunol. **161** (9): 4484-4488.
276. Sevilla J, Fernandez-Plaza S, Diaz MA, Madero L; Paediatric Disease Working Party of the EBMT. (2005) Hematopoietic transplantation for bone marrow failure syndromes and thalassemia. Bone Marrow Transplant. **35** Suppl 1: 17-21. Review.
277. Sharp TG, Sachs DH, Fauci AS, Messerschmidt GL, Rosenberg SA (1983). T cell depletion of human bone marrow using monoclonal antibody and complement-mediated lysis. Transplantation. **35** (2): 112-20.
278. Shi YF, Sahai BM, Green DR (1989). Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes. Nature **339** (6226): 625-626.
279. Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, McDonald GB, Striker GE, Sale GE, Hackman R, Tsoi MS, Storb R, Thomas ED (1980). Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. Am J Med. **69** (2): 204-217.
280. Shevach EM, DiPaolo RA, Andersson J, Zhao DM, Stephens GL, Thornton AM (2006). The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. Immunol Rev. **212**: 60-73. Review.
281. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S (2002). Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. Nat Immunol. **3** (2): 135-142.

282. Siena S, Bregni M, Brando B, Ravagnani F, Bonadonna G, Gianni AM, (1989). Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Blood **74** (6): 1905-1914.
283. Spitzer T, (2005). Haploidentical stem cell transplantation: the always present but overlooked donor. Hematology 2005 (ASH Meeting Education program book) 391-395.
284. Socinski MA, Elias A, Schnipper L, Cannistra SA, Antman KH, Griffin JD (1988). Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating haematopoietic progenitor cell compartment in man. Lancet **1**: 1194.
285. Solomon SR, Mielke S, Savani BN, Montero A, Wisch L, Childs R, Hensel N, Schindler J, Ghetie V, Leitman SF, Mai T, Carter CS, Kurlander R, Read EJ, Vitetta ES, Barrett AJ (2005). Selective depletion of alloreactive donor lymphocytes: a novel method to reduce the severity of graft-versus-host disease in older patients undergoing matched sibling donor stem cell transplantation. Blood **106** (3): 1123-1129.
286. Sorell M, Kapoor N, Kirkpatrick D, Rosen JF, Chaganti RS, Lopez C, Dupont B, Pollack MS, Terrin BN, Harris MB, Vine D, Rose JS, Goossen C, Lane J, Good RA, O'Reilly RJ, (1981). Marrow transplantation for juvenile osteopetrosis. Am J Med. **70** (6):1280-7.
287. Steller H (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. Science **267** (5203):1445-1449. Review.
288. Stokes TA, Rymaszewski M, Arscott PL, Wang SH, Bretz JD, Bartron J, Baker JR (1998). Technical comments: Constitutive expression of Fas L in Thyrocytes. Science **279**: 2015a.
289. Storb R, Buckner CD, Fefer A, Clift RA, Neimann PE, Gluksberg H, Lerner KG, Thomas ED (1974). Marrow transplantation in aplastic anemia. Transpl Proc. **6** (4): 355-358.
290. Storkus WJ, Howell DN, Salter RD, Dawson JR, Cresswell P,(1987). NK susceptibility varies inversely with target cell class I HLA Antigen expression. J. Immunol. **138** (6): 1657-1659.
291. Straus SE, Jaffe ES, Puck JM, Dale JK, Elkon KB, Rosen-Wolff A, Peters AM, Sneller MC, Hallahan CW, Wang J, Fischer RE, Jackson CM, Lin AY, Baumler C, Siegert E, Marx A, Vaishnav AK, Grodzicky T, Fleisher TA, Lenardo MJ (2001). The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations anddefective lymphocyte apoptosis. Blood **98** (1): 194-200.
292. Strauss G, Knappe I, Melzner I, Debatin KM (2003). Constitutive Caspase Activation and impaired death-inducing signaling complex formation in CD95-resistant, long-term activated, antigen-specific T cells. J Immunol. **171**: 1172-1182.
293. Strauss G, Osen W, Knappe I, Jacobsen EM, Muller SM, Debatin KM (2007). Membrane-bound CD95 ligand expressed on human antigen-

- presenting cells prevents alloantigen-specific T cell response without impairment of viral and third-party T cell immunity. Cell Death Differ. **14**: 480-488.
294. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S, (1993). Molecular cloning and expression of the Fas Ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. Cell **75**: 1169-1178.
  295. Suda T, Okazaki T, Naito Y, Takashi Y, Arai N, Ozaki S, Nakao K, Nagata S (1995). Expression of the Fas Ligand in cells of T cell lineage. J Immunol **154**: 3806-3813.
  296. Suda T, Hashimoto, H, Miwa K, Nagata S, (1996). Apoptosis of mouse naive T cells induced by recombinant soluble fas ligand and activation-induced resistance to fas ligand. J. immunol. **157**: 3918-3924.
  297. Suda T, Hashimoto H, Tanaka M, Ochi T, Nagata S, (1997). Membrane fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble fas ligand blocks the killing. J. exp. Med. **186**: 2045-2050.
  298. Sukharev SI, Blount P, Martinac B, Blattner FR, Kung C (1994). A large-conductance mechanosensitive channel in E.coli encoded by mscL alone. Nature **368** (6468): 265-268.
  299. Sullivan KM, Agura E, Anasetti C, Appelbaum F, Badger C, Bearman S, Erickson K, Flowers M, Hansen J, Loughran T, et al (1991). Chronic graft-versus-host disease and other late complications of bone marrow transplantation. Semin Hematol. **28** (3): 250-259. Review.
  300. Süß G, Shortman K, (1996). A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-Ligand-induced apoptosis. J. Exp. Med. **183**: 1789-1796.
  301. Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM (1998). CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. J Immunol. **160** (3): 1212-1218.
  302. Sykes M, Preffer F, McAfee S, Saidman SL, Weymouth D, Andrews DM, Colby C, Sackstein R, Sachs DH, Spitzer TR (1999). Mixed lymphohaemopoietic chimerism and graft-versus-lymphoma effects after non-myeloablative therapy and HLA-mismatched bone-marrow transplantation. Lancet **353** (9166): 1755-1759.
  303. Tabbara IA, Kairouz S, Nahleh Z, Mihalcea AM. Current concepts in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (2003). Anticancer Res. **23** (6D): 5055-5067. Review.
  304. Takahashi T, Tanaka M, Inazawa J, Abe T, Suda T, Nagata S (1994). Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. Int Immunol. **6** (10): 1567-1574.
  305. Takeuchi T, Ueki T, Nishimatsu H, Kajiwarra T, Ishida T, Jishage K, Ueda O, Suzuki H, Li B, Moriyama N, Kitamura T (1999). Accelerated rejection of Fas ligand-expressing heart grafts. J Immunol. **162** (1): 518-522.

306. Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S, (1995). Expression of the functional soluble form of human Fas ligand in activated lymphocytes. Embo J. **14** (6): 1129-1135
307. Tanaka M, Suda T, Haze K, Nakamura N, Sato K, Kimura F, Motoyoshi K, Mizuki M, Tagawa S, Ohga, S, Hatake K, Drummond AH, Nagata S, (1996). Fas ligand in human serum. Nature Med. **2** (3): 317-322.
308. Tanaka M, Itai T, Adachi M, Nagata S, (1998). Downregulation of Fas ligand by shedding. Nature Med. **4** (1): 31-36.
309. Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, Finger EB, Szot G, Ye J, Masteller EL, McDevitt H, Bonyhadi M, Bluestone JA (2004). In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. J Exp Med. **199** (11): 1455-1465.
310. Tarbell KV, Yamazaki S, Olson K, Toy P, Steinman RM (2004). CD25+CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. J Exp Med. **199** (11): 1467-1477
311. Tavassoli M, Crosby WH, (1968). Transplantation of marrow to extramedullary sites. Science. **161** (836): 54-56.
312. Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR (2002). The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. Blood **99** (10): 3493-3499.
313. Thiele DL, Lipsky PE (1990). Mechanism of L-leucyl-L-leucine methyl ester-mediated killing of cytotoxic lymphocytes: dependence on a lysosomal thiol protease, dipeptidyl peptidase I, that is enriched in these cells. Proc Natl Acad Sci USA. **87** (1): 83-87.
314. Thomas ED, Collins JA, Herman EC Jr, Ferrebee JW (1962). Marrow transplants in lethally irradiated dogs given methotrexate. Blood **19**: 217-228.
315. Thomas ED, Storb R, (1970). Technique for human marrow grafting. Blood **36**: 507-515.
316. Thomis DC, Marktel S, Bonini C, Traversari C, Gilman M, Bordignon C, Clackson T (2001). A Fas-based suicide switch in human T cells for the treatment of graft-versus-host disease. Blood **97** (5): 1249-1257.
317. Thompson CB (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science **267**: 1456-1462.
318. Thornton AM, Shevach EM (2000). Suppressor effector function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells is antigen non-specific. J Immunol. **164**: 183-190.
319. Thornton AM, Donovan EE, Piccirillo CA, Shevach EM (2004). Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell suppressor function. J Immunol. **172** (11): 6519-6523.

320. Tiberghien P, Ferrand C, Lioure B, Milpied N, Angonin R, Deconinck E, Certoux JM, Robinet E, Saas P, Petracca B, Juttner C, Reynolds CW, Longo DL, Herve P, Cahn JY (2001). Administration of herpes simplex-thymidine kinase-expressing donor T cells with a T-cell-depleted allogeneic marrow graft. Blood **97** (1): 63-72.
321. Tourneur L, Malassagne B, Batteux F, Fabre M, Mistou S,ALLEMAND E, Lores P, Chiocchia G (2001). Transgenic expression of CD95 ligand on thyroid follicular cells confers immune privilege upon thyroid allografts. J Immunol. **167** (3): 1338-1346.
322. Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH (1989). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. Science **245** (4915): 301-305.
323. Trenado A, Charlotte F, Fisson S, Yagello M, Klatzmann D, Salomon BL, Cohen JL (2003). Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. J Clin Invest. **112** (11): 1688-1696.
324. Trenado A, Fisson S, Braunberger E, Klatzmann D, Salomon BL, Cohen JL (2004). Ex vivo selection of recipient-type alloantigen-specific CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells for the control of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. Transplantation **77** (1 Suppl): 32-34. Review.
325. Tse W, Laughlin MJ, (2005). Umbilical cord blood transplantation: A new alternative option. Hematology (ASH-Meeting education program Book): 377-382.
326. Uckan D, Steele A, Cherry, Wang BY, Chamizo W, Koutsonikolis A, Gilbert-Barness E, Good RA (1997). Trophoblasts express Fas ligand: a proposed mechanism for immune privilege in placenta and maternal invasion. Mol Hum Reprod. **3** (8): 655-662.
327. Van Bekkum DW, de Vries MJ, van der Waay D, (1967). Lesions characteristic of secondary disease in germfree heterologous radiation chimeras. J. Natl. Cancer Inst. **38** (2): 223-231.
328. Valmori D, Merlo A, Souleimanian NE, Hesdorffer CS, Ayyoub M (2005). A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs. J. Clin. Invest. **115**: 1953-1962.
329. Villa P, Kaufmann SH, Earnshaw WC (1997). Caspases and caspase inhibitors. Trends Biochem Sci. **22** (10): 388-393. Review.
330. Villunger A, Egle A, Marschitz I, Kos M, Böck G, Ludwig H, Geley S, Kofler R, Greil R, (1997). Constitutive expression of Fas (Apo-1/CD95) Ligand on multiple Myeloma cells: a potential mechanism of tumor-induced suppression of immune surveillance. Blood **90** (1): 12-20.
331. Vogelsang G, (2001). How I treat chronic graft-versus-host disease. Blood **97** (5): 1196-1201. Review.

332. Vogelsang G, Lee L, Bensen-Kenneda DM (2003). Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. Annu. Rev. Med. **54**: 29-52. Review.
333. Vonarbourg C, Stolzenberg M-C, Hölzelova E, Fischer A, Le Deist F, Rieux-Laucat F, (2002). Differential sensitivity of Jurkat and primary T cells to caspase-independent cell death triggered upon Fas stimulation. Eur. J. Immunol. **32**: 2376-2384.
334. Waldmann H, Graca L, Cobbold S, Adams E, Tone M, Tone Y (2004). Regulatory T cells and organ transplantation. Semin Immunol. **16** (2): 119-126. Review.
335. Walker MR, Kasprovicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, Ziegler SF (2003). Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. J Clin Invest. **112** (9): 1437-1443.
336. Walker MR, Carson BD, Nepom GT, Ziegler SF, Buckner JH (2005). De novo generation of antigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells from human CD4+CD25- cells. Proc Natl Acad Sci U S A. **102** (11): 4103-4138.
337. Wang B, Geng YB, Wang CR (2001). CD1-restricted NK T cells protect nonobese diabetic mice from developing diabetes. J Exp Med. **194** (3): 313-320.
338. Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TWJ, Toes REM (2007) Transient expression of FoxP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. Eur. J. Immunol. **37** (1): 129-138.
339. Whartenby KA, Straley EE, Kim H, Racke F, Tanavde V, Gorski KS, Cheng L, Pardoll DM, Civin CI (2002). Transduction of donor hematopoietic stem-progenitor cells with Fas ligand enhanced short-term engraftment in a murine model of allogeneic bone marrow transplantation. Blood **100** (9): 3147-3154.
340. Weiner HL (2001). Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. Immunol Rev. **182**: 207-214. Review.
341. Weiss A, *et al.* (1984). The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL-2 production reflects events occurring at a pre-translational level. J. Immunol. **133**: 123-128.
342. Wenger T, Mattern J, Penzel R, Gassler N, Haas TL, Sprick MR, Walz H, Krammer PH, Debatin KM, Herr I, (2006). Specific resistance upon lentiviral TRAIL transfer by intracellular retention of TRAIL receptors. Cell Death Diff. **13** (10): 1740-1751.
343. Wiesneth M, Hertenstein B, Bunjes D, Schmeiser T, Arnold R, Heimpel H, Heit W (1988). T-cell depletion versus methotrexate as GvHD-prophylaxis in allogeneic bone marrow transplantation for leukaemia. Eur J Haematol. **41**(3): 243-249.

344. Wiesneth M, Schreiner T, Friedrich W, Muller S, Maccari B, Erne E, Bischof C, Kubanek B (1996). Combined CD34 positive plus CD2 negative selection for effective T-cell depletion as GvHD-prophylaxis in HLA-nonidentical blood progenitor cell transplantation. Transfus Sci. **17** (4): 629-635.
345. Wiesneth M, Schreiner T, Friedrich W, Bunjes D, Duncker C, Krug E, Maccari B, Muller S, Nowak S, Kubanek B (1998). Mobilization and collection of allogeneic peripheral blood progenitor cells for transplantation. Bone Marrow Transplant. **21** Suppl 3:S21-24.
346. Williams MA, Onami TM, Adams AB, Durham MM, Pearson TC, Ahmed R, Larsen CP (2002). Cutting edge: persistent viral infection prevents tolerance induction and escapes immune control following CD28/CD40 blockade-based regimen. J Immunol. **169** (10):5387-5391.
347. Williams LM, Rudensky AY (2007). Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. Nat. Immunol. **8** (3): 277-284.]
348. Wolfe T, Asseman C, Hughes A, Matsue H, Takashima A, v. Herrath MG, (2002). Reduction of antiviral CD8 Lymphocytes in vivo with dendritic cells expressing Fas Ligand – increased survival of viral (lymphocytic choriomeningitis virus) central nervous system infection. J. Immunol. **169**: 4867-4872.
349. Wood KJ, Sakaguchi S (2003). Regulatory T cells in transplantation tolerance. Nature Rev Immunol. **3**: 199-210.
350. Woods NB, Bottero V, Schmidt M, von Kalle C, Verma IM, (2006). Gene therapy: therapeutic gene causing lymphoma. Nature **440** (7088): 1123.
351. Wu B, Wu JM, Miagkov A, Adams RN, Levitsky HI, Drachman DB, (2001). Specific immunotherapy by genetically engineered APCs: The „guided missile“ strategy. J. Immunol. **166**: 4773-4779.
352. Wu J, Wilson J, He J, Xiang L, Schur PH, Mountz JD (1996). Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. J Clin Invest. **98** (5): 1107-1113.
353. Yamaguchi T, Sakaguchi S (2006). T cells in immune surveillance and treatment of cancer. Semin Cancer Biol. **16**: 115-123.
354. Yamazaki S, Patel M, Harper A, Bonito A, Fukuyama H, Pack M, Tarbell KV, Talmor M, Ravetch JV, Inaba K, Steinman RM (2006). Effective expansion of alloantigen-specific Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells by dendritic cells during the mixed leukocyte reaction. Proc Natl Acad Sci U S A. **103** (8): 2758-2763.
355. Yeh WC, Pompa JL, McCurrach ME, Shu HB, Elia AJ, Shahinian A, Ng M, Wakeham A, Khoo W, Mitchell K, El-Deiry WS, Lowe SW, Goeddel DV, Mak TW (1998). FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. Science **279** (5358): 1954

356. Yonehara S, Ishii A, Yonehara M (1989). A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. J Exp Med. **169** (5): 1747-1756.
357. Zakrzewski JL, Kochman AA, Lu SX, Terwey TH, Kim TD, Hubbard VM, Muriglan SJ, Suh D, Smith OM, Grubin J, Patel N, Chow A, Cabrera-Perez J, Radhakrishnan R, Diab A, Perales MA, Rizzuto G, Menet E, Pamer EG, Heller G, Zuniga-Pflucker JC, Alpdogan O, van den Brink MR (2006). Adoptive transfer of T-cell precursors enhances T-cell reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Nat Med. **12** (9): 1039
358. Zecca M, Prete A, Rondelli R, Lanino E, Balduzzi A, Messina C, Fagioli F, Porta F, Favre C, Pession A, Locatelli F; AIEOP-BMT Group (2002). Italian Association for Pediatric Hematology and Oncology-Bone Marrow Transplant. Chronic graft-versus-host disease in children: incidence, risk factors, and impact on outcome. Blood **100** (4):1192-200.
359. Zeiser R, Bertz H, Spyridonidis A, Houet L, Finke J (2004). Donor lymphocyte infusions for multiple myeloma: clinical results and novel perspectives. Bone Marrow Transplant. **34** (11): 923-928. Review.
360. Zemmour J, Little AM, Schendel DJ, Parham P, (1992). The HLA-A,B „negative“ mutant cell line C1R expresses a novel HLA-B35 allele, which also has a point mutation in the translation initiation codon. J. Immunol. **148** (6): 1941-1948.
361. Zeng D, Lan F, Hoffmann P, Strober S (2004). Suppression of graft-versus-host disease by naturally occurring regulatory T cells. Transplantation **77** (1 Suppl): 9-11. Review.
362. Zhang J, Cado D, Chen A, Kabra NH, Winoto A (1998-a). Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. Nature **392** (6673): 296-300.
363. Zhang H, Liu D, Heike Y, Yang P, Wang X, Curiel DT, Zhou T, Mountz JD, (1998-b). Induction of specific T-cell tolerance by adenovirus-transfected, Fas ligand-producing antigen presenting cells. Nature Biotech. **16**: 1045-1049.
364. Zhang H, Su X, Liu D, Liu W, Yang P, Wang Z, Edwards CK, Bluethmann H, Mountz J, Zhou T, (1999). Induction of specific T cell tolerance by Fas Ligand-expressing antigen-presenting cells. J. Immunol. **162**: 1423-1430.
365. Zhang H, Fleck M, Kern ER, Liu D, Wany Y, Hsu HC, Yang P, Wang Z, Curiel DT, Zhou T, Mountz JD, (2000). Antigen presenting cells expressing Fas ligand down-modulate chronic inflammatory disease in Fas ligand-deficient mice. J. Clin. Invest. **105** (6): 813-821.
366. Ziegler SF (2007). Commentary: FoxP3: Not just for regulatory T cells anymore. Eur. J. Immunol. **37**: 21-23.



## 8 ANHANG

### 8.1 CD95L Antikörpervergleich

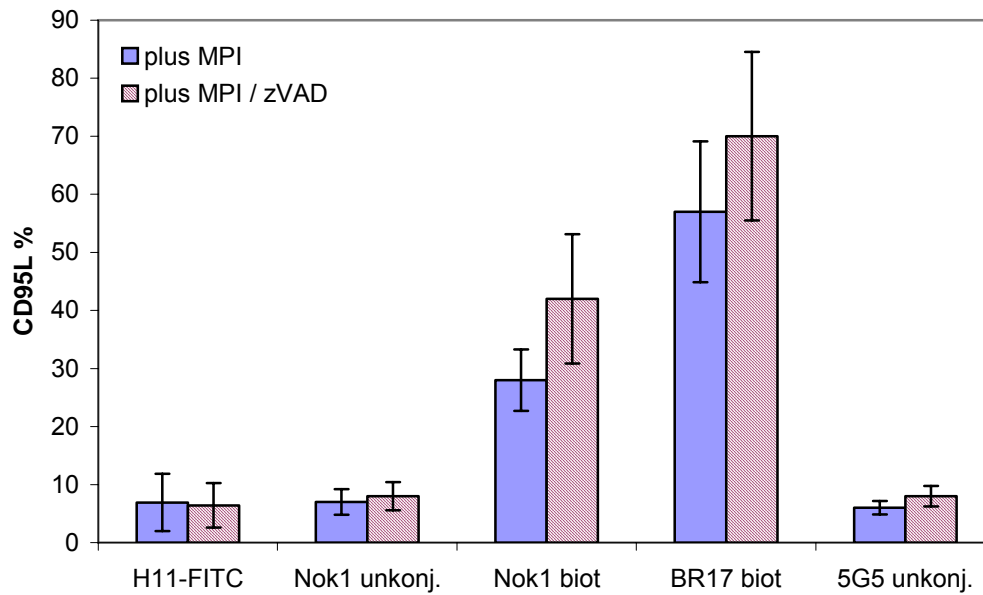
Zu Beginn der Doktorarbeit standen eine Reihe von Antikörpern für den durchflusszytometrischen Nachweis von humanem CD95L zur Verfügung. Allerdings stellte die geringe Oberflächenexpression des Liganden auf Lymphozyten eine Herausforderung dar, so dass die Ansprüche an CD95L Antikörper eine hohe Sensibilität und ausreichende Fluoreszenzintensität einschlossen. Zudem wurden Studien, in denen der Nachweis von CD95L eine wichtige Rolle spielte, im Nachhinein in Frage gestellt, da die Spezifität der verwendeten Antikörper umstritten war (Giordano et al. 1997, Stokes et al. 1998, Fiedler et al. 1998, Papoff et al. 1998). Um dieses Problem zu vermeiden, wurden eigene Untersuchungen zur Spezifität der von uns verwendeten Antikörper durchgeführt.

#### 8.1.1 Vergleich der Fluoreszenzintensität verschiedener CD95L Antikörper

Für den Vergleich von 5 verschiedenen anti-CD95L Antikörpern wurde eine von uns etablierte Lymphozyten-Stimulationskultur verwendet. Wie nachfolgend (Abschnitt 8.2.1.1.) beschrieben, konnte CD95L reproduzierbar auf langzeitstimulierten T-Zellen nachgewiesen werden, die vor dem Nachweis mit Ionomycin und Metalloproteinaseinhibitor (MPI – verhindert das Abspalten von CD95L von der Zelloberfläche) inkubiert wurden. Die CD95L-Expression ließ sich meist durch den Einsatz des Caspaseinhibitors zVAD (inhibiert die Apoptose) noch steigern.

Wie in Abb. 8.1. gezeigt, war die Fluoreszenzintensität des biotinylierten Antikörperklon Nok1 deutlich höher als die des unkonjugierten Nok1, welcher mit PE-konjugiertem goat-anti-mouse AK nachgewiesen wurde. Der Nachweis mit dem unkonjugierten AK-Klon 5G5 war vergleichbar mit unkonjugiertem Nok1. Der biotinylierte AK-Klon BR17 erbrachte die stärksten Signale. Mit dem FITC-konjugierten Antikörperklon H11 waren größere Schwankungen der Nachweisintensitäten bei insgesamt schwachen Signalen verbunden. Auffallend war, dass durch H11 vorallem tote Zellen markiert wurden (nicht gezeigt), der Einsatz des Caspase- (und damit Apoptose-) Inhibitors zVAD erbrachte folglich auch keinen verbesserten Nachweis. Zusammengefasst waren die biotinylierten Antikörperklone Nok1 und BR17 am Besten für den CD95L-Nachweis geeignet.

### Vergleich CD95L Antikörper



**Abb. 8.1. Vergleich der Fluoreszenzintensität verschiedener CD95L Antikörper.** Lymphozyten, die über 20 Tage mit PHA stimuliert worden waren, wurden für 20 Stunden mit Ionomycin und Metalloproteinaseinhibitor (MPI) inkubiert. Zu einer Hälfte der Ansätze wurde der Caspaseinhibitor zVAD hinzugefügt. Der CD95L Nachweis erfolgte zeitgleich mit allen Antikörpern. Jeweils 100 000 Zellen wurden pro Ansatz markiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 5 Experimenten.

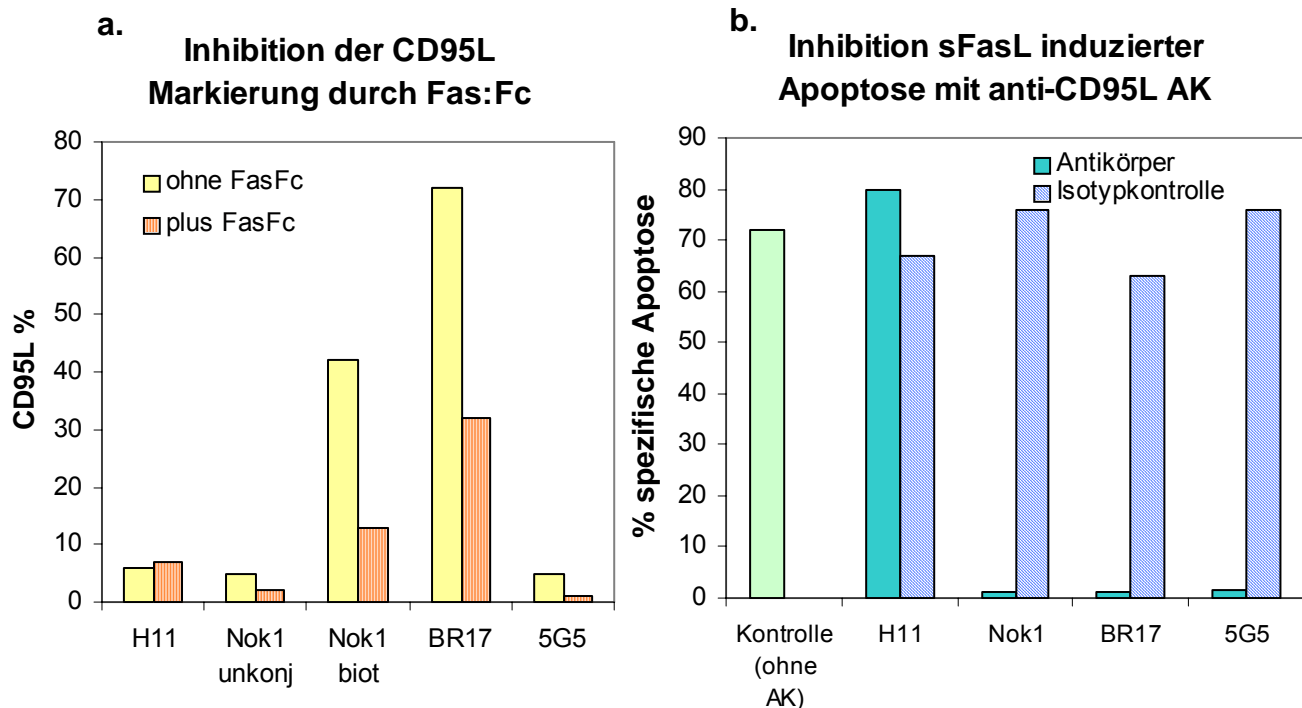
#### 8.1.2 Spezifität der CD95L Antikörper

Um die Spezifität von CD95L Antikörpern zu untersuchen, verfolgten wir zwei Strategien.

Das chimäre Molekül Fas:Fc, das aus der extrazellulären CD95 Rezeptor Domäne und dem Fc Teil von humanem IgG1 besteht, bindet an CD95L und blockiert damit den Nachweis des Liganden durch anti-CD95L Antikörper. Nach Präinkubation mit Fas:Fc fanden wir einen deutlich reduzierten Nachweis mit den biotinylierten AK-Klonen Nok1 und BR17. Durch die insgesamt geringe Fluoreszenzintensität der unkonjugierten Antikörper, konnte bei Klon 5G5 und Nok1 unkonjugiert nur eine schwache Reduktion des Signals erreicht werden. Keinen Einfluss hatte Fas:Fc auf den Nachweis mit H11, wobei auch hier die Signale sehr schwach waren (Abb. 8.2 a).

In einem weiteren Ansatz blockierten wir die Apoptoseinduktion durch humanen, löslichen CD95L (sFasL) in Jurkat-Zellen mittels Koinkubation mit CD95L-Antikörpern. Diese binden an sFasL und inhibieren somit die Apoptoseinduktion. Mit den Antikörperklonen BR17, Nok1 und 5G5 gelang eine komplette Inhibition der sFasL-induzierten Apoptose, während H11 keinen Einfluss hatte (Abb. 8.2.).

Zusammengefasst fanden wir CD95L Spezifität der Antikörperklone Nok1, BR17 und 5G5, während H11 in unseren Experimenten nicht spezifisch für humanen CD95L war.



**Abb. 8.2. Spezifität verschiedener CD95L Antikörper.** a. Inhibition der Antikörperbindung durch FasFc. Der CD95L Nachweis erfolgte an d20 PHA stimulierten T-Zellen, die mit Ionomycin, MPI und zVAD inkubiert worden waren. Zur Blockierung der Bindung wurde Fas:Fc nach Anleitung des Herstellers verwendet. b. Inhibition sFasL-induzierter Apoptose in Jurkat-Zellen durch Koinkubation mit CD95L Antikörpern. Jurkat Zellen wurden mit 500ng/ml sFasL unter gleichzeitiger Zugabe von 10µg/ml anti-CD95L-AK bzw. Isotypen-AK über 24 Std inkubiert. Der Apoptosenachweis erfolgte mit Annexin und die Berechnung der spezifischen Apoptose unter Berücksichtigung der Spontanapoptose wie unter 2.2.12.3. beschrieben.

## 8.2 Etablierung des Nachweises von Oberflächen CD95L in der Durchflußzytometrie

Um den Nachweis von CD95L für spätere Transfektionsexperimente zu etablieren, wurde zunächst Expression von CD95L auf aktivierten T-Zellen untersucht. Hierzu wurden verschiedene Stimulationssysteme (immobilisiertes OKT3, OKT3/CD28, PHA, Allostimulation, Kurzzeit- und Langzeitstimulationen) untersucht und verglichen.

Der Nachweis des Moleküls erwies sich zunächst als schwierig, zum einen bedingt durch die Tatsache, dass CD95L durch Metalloproteinasen von der Zelloberfläche abgespalten wird (Kayagaki et al. 1995, Tanaka et al. 1995). Durch den Einsatz von Metalloproteinaseinhibitor (MPI), der das Abspalten des Moleküls verhindert, konnten die Ergebnisse verbessert werden. Ein zweites

Problem stellte der Zellverlust durch auto- und parakrine Apoptose nach Induktion von Oberflächen-CD95L dar. Die Verwendung des Caspase-Inhibitors z-VAD in Kombination mit MPI führte durch die Herabsetzung der Apoptoserate zu einer deutlichen Verbesserung des Nachweises.

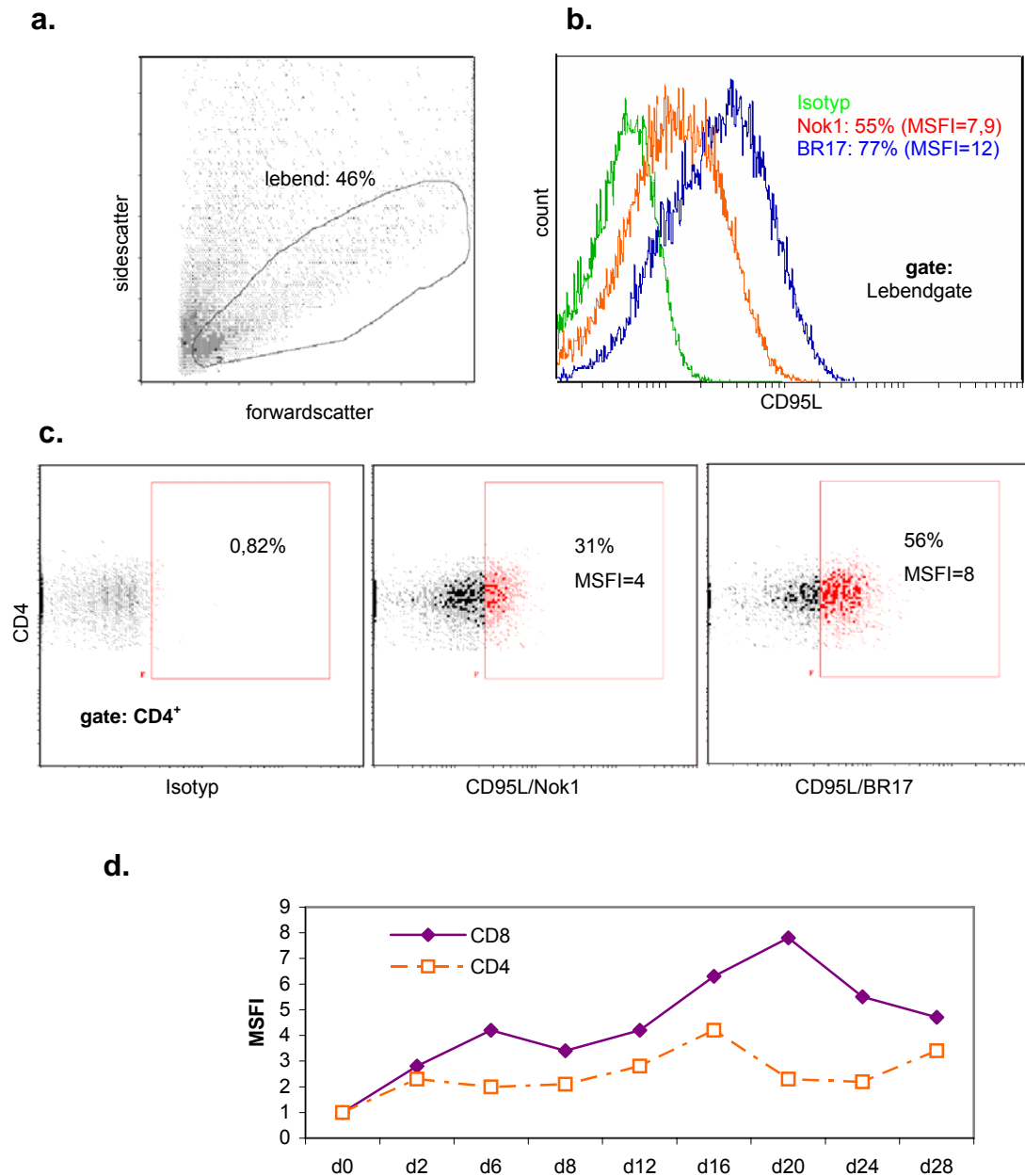
Die insgesamt geringe Expression von CD95L auf aktivierten T-Zellen konnte durch erneute Stimulation mit PMA/Ionomycin nach der Primärstimulation mit PHA oder OKT3/CD28 gesteigert werden. Da CD4 jedoch nach PMA-Stimulation internalisiert wird (Bigby *et al.*, 1990), war CD95L auf diesen Zellen durchflusszytometrisch nicht zuverlässig nachweisbar (nicht gezeigt). Durch den Einsatz von Ionomycin ohne PMA, wurde dieses Problem umgangen.

Zu Beginn unserer Experimente galt der Nachweis von CD95L durch Westernblotting als Standardmethode und wir konnten mit dieser Methode das Molekül in stimulierten Lymphozyten nachweisen (nicht gezeigt).

Neben der intrazellulären Speicherung von CD95L in Vesikeln ist sowohl eine membrangebunden (mCD95L) als auch (nach Abspaltung von der Zelloberfläche) eine lösliche Form (sCD95L) des Moleküls nachgewiesen (Suda *et al.*, 1993; Kayagaki *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1995, 1996, 1998; Albanese *et al.*, 1998; Bossi und Griffiths, 1999; Martinez-Lorenzo *et al.*, 1999).

Die höchste Effektivität der Apoptoseinduktion ist für die membrangebundene, an der Zelloberfläche exprimierte Form von CD95L beschrieben (Suda *et al.*, 1997, Tanaka *et al.*, 1998). Da der Westernblot keine Differenzierung zwischen intrazellulären und membrangebundenem CD95L zulässt, wurde zur Analyse von mCD95L die Durchflusszytometrie eingesetzt.

Der Nachweis von CD95L gelang schließlich reproduzierbar in Langzeit-Stimulationskulturen mit PHA, OKT3/CD28 oder allogener Stimulation und anschließender Restimulation für 24h mit Ionomycin. Die stärksten Signale wurden mit biotinylierten Antikörpern (Klone Nok1 und BR17) durch die Verstärkung mit Streptavidin-PE erreicht. Hierbei war zwar keine klare Population abgrenzbar, aber eine deutliche Fluoreszenzverschiebung (Mean Shift in Fluorescence Intensity, MSFI) gegeben. Der MSFI der CD95L-Expression auf CD8<sup>+</sup> war zwischen 1,5 - 4 mal höher als auf CD4<sup>+</sup>. Die Ergebnisse sind repräsentativ für alle Stimulationskulturen mit OKT3/CD28 in Abb. 8.3. gezeigt.

**Abb. 8.3.**

**CD95L Oberflächenexpression stimulierter Zellen.** MNC wurden mit OKT3/CD28 für 19 Tage bzw. wie angegeben (Abb. d) stimuliert. Die Restimulation mit Ionomycin erfolgte unter Zugabe von Metalloproteinaseinhibitor (MPI) und dem Caspaseinhibitor z-VAD für 24h. Die Detektion von CD95L erfolgte mit den biotinylierten Antikörperklonen Nok1 und BR17 wie in den Graphiken angegeben. **a. Lebendgate** Viable Zellen wurden anhand ihrer Eigenschaften in Größe (Forwardscatter) und Granularität (Sidescatter) eingegrenzt. **b. CD95L-Expression auf viablen Zellen** (Lebendgate). **c. Darstellung von CD95L auf CD4<sup>+</sup> Zellen.** Nach Gegenfärbung mit anti-CD4 konnte CD95L im CD4<sup>+</sup>-Gate nachgewiesen werden.

**d. CD95L Expressionskinetik CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen.** Der Nachweis von CD95L erfolgte nach Färbung mit Klon Nok1 in Gegenfärbung mit CD4 und CD8 zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Fluoreszenzverschiebung, MSFI wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{MSFI} = \frac{\text{mittlere Fluoreszenzintensität AK (Nok1/BR17)}}{\text{mittlere Fluoreszenzintensität Isotypkontrolle}}$$

## 9 PUBLIKATIONEN

**Strauss G, Osen W, Knape I, Jacobsen EM, Müller SM, Debatin KM. (2007)**  
Membrane-bound CD95 ligand expressed on human antigen-presenting cells prevents alloantigen-specific T cell response without impairment of viral and third-party T cell immunity. Cell Death Differ. **14: 480-488.**

**Eva-Maria Jacobsen, Till Wenger, Ingrid Herr, Gudrun Strauss, Klaus-Michael Debatin, Wilhelm Friedrich, and Susanna M. Müller.** Effective Depletion of Alloreactive T Cells by CD95L-Transduced Cells with Preservation of FoxP3 Regulatory T-Cells. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2005; **106: 1258.**

**Eva-Maria Jacobsen, Markus Ege, Karin Freudenreich, Klaus-Michael Debatin, Wilhelm Friedrich, Susanna M. Müller.** Stable expression and detection of surface CD95L by activated T-cells. Exp.Hematol. Jun 2002 **30 (6), suppl. 1 (ISEH Meeting Abstract)**

**Eva-Maria Jacobsen, Till Wenger, Ingrid Herr, Wolfram Osen, Gudrun Strauss, Klaus-Michael Debatin, Wilhelm Friedrich, Susanna M. Müller**  
Specific depletion of alloactivated T-cells by a CD95L-expressing cell line selects for FoxP3+ regulatory T-cells. **In Vorbereitung, wird eingereicht bei BMT**

## 10 LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

<b>Name</b>	Eva-Maria Jacobsen
<b>Anschrift</b>	In der Wanne 33, 89075 Ulm
<b>Geburtsdatum und -ort</b>	16. November 1963 in Langenau Mutter: Theolinde Jacobsen, geb. 16.09.1944 Vater: Manfred Jacobsen, geb. 24.07.1940
<b>Familienstand</b>	verheiratet seit 2002
<b>Ehemann</b>	Dr. med. Gereon Jacobsen, geb. Großmann, Arzt
<b>Kinder</b>	Saviya, geb. 19. Juni 1997 Matteo, geb. 08. Feb. 2000 Mareike, geb. 04. Okt. 2002

### Schulische Ausbildung

<b>Grundschule</b>	1969-1974, Eduard-Mörike Grund- und Hauptschule Ulm
<b>Realschule</b>	1974-1980, Friedrichsau-Realschule Ulm (Realschulabschluss)
<b>Fachoberschule</b>	1980-1981, Fachoberschule Neu-Ulm
<b>berufliches Gymnasium</b>	1981-1984, Valckenburgschule Ulm (HG) (Allg. Hochschulreife/ Abitur)

### Berufsausbildung/Berufstätigkeit

<b>Kinderkrankenpflegeschule Ulm</b>	1985-1988, Ausbildung zur Kinderkrankenschwester (Examen, Gesamtnote: Sehr gut)
<b>Uni-Kinderklinik Ulm</b>	1988-1991, Kinderkrankenschwester

### Studium

<b>Universität Marburg</b>	1991-1996, Studium der Humanbiologie 1993 Vordiplom, Gesamtnote: gut 1996 Diplom, Gesamtnote: sehr gut 1996 Diplomarbeit: „ <i>Charakterisierung einer Kontrollregion des Kandidatengens für das Greig-Syndrom</i> “, Note: sehr gut
----------------------------	---

### Promotion

<b>Forschungslabor der Uni-Kinderklinik Ulm, Transplantations-Immunologie</b>	1998 – 2008 (während dieser Zeit insgesamt Stipendium über 4 Jahre, Unterbrechungen wegen Mutterschutz/ Elternzeit)
---	---

### Sonstiges

<b>Auslandsaufenthalte</b>	1984 (7 Monate) Au-Pair, Paris, Frankreich 1988 (6 Monate) Kinderkrankenschwester, Thun, Schweiz
----------------------------	---

## 11 VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren (in alphabetischer Reihenfolge)

Prof. Dr. Aumüller

Prof. Dr. Dressler

Prof. Dr. Elsässer

Prof. Dr. Fischer

Prof. Dr. Frenking

Prof. Dr. Garten

Prof. Dr. Gemsa

Prof. Dr. Grzeschik

Prof. Dr. Habermehl

Prof. Dr. Hartmann

Prof. Dr. Kaffarnik

Prof. Dr. Kern

Prof. Dr. Klenk

Prof. Dr. Koolmann

Prof. Dr. Lang

Prof. Dr. Mannherz

Prof. Dr. Melsheimer

Prof. Dr. R. Müller

Prof. Dr. Petzoldt

Prof. Dr. Radsak

Prof. Dr. Schachtschabel

Prof. Dr. Schäfer

Prof. Dr. Seitz



## 12. DANKSAGUNG

Besonderer Dank gebührt Frau PD. Dr. Susanna Müller für all ihre Unterstützung, in jeglicher Hinsicht, die langen Jahre intensiver und guter Betreuung und Zusammenarbeit, dafür dass sie mich stets ermutigt hat, für ihre Geduld, für ihr immenses fachliches Know-How, welches sie stets an mich weitergab, die vielen kreativen Ideen, die in meine Arbeit einfließen und diese entscheidend geprägt haben. Danken möchte ich ihr auch insbesondere für die vielen guten Gespräche und unser freundschaftliches Verhältnis!

Herrn Prof. Dr. Wilhelm Friedrich möchte ich herzlichst danken für die Selbstverständlichkeit, mit der ich in seiner Abteilung als junge Mutter trotz eingeschränktem Arbeitszeitpensum promovieren durfte, für die intensive Zusammenarbeit, dafür dass auch er mich immer, sowohl fachlich als auch moralisch unterstützt hat, für sein geduldiges Korrekturlesen und dafür, dass er die Begeisterung und das Interesse für das Thema Knochenmark-/Stammzelltransplantation, welche ich bereits als Kinderkrankenschwester auf seiner KMT-Station gewonnen hatte, ausschlaggebend mitbestimmt hat.

Beiden danke ich für die Bereitstellung des Themas, für die schöne Atmosphäre im Parkstraßenlabor und für die vielen Abende des kulinarischen Fachsimpelns im „da Paolo“.....!

Herrn Prof. Dr. Debatin danke ich für alles, was ich über Apoptose gelernt habe, bessere fachliche Kompetenz hätte ich schwerlich finden können!

Herrn Prof. Dr. Gerns in Marburg danke ich für die unkomplizierte Bereitschaft, mich als externe Doktorandin anzunehmen, für die Korrektur der Arbeit und seine Herzlichkeit!

Ganz besonders danke ich Karin Freudenreich und Andrea Hänsler! Beide gaben ihre hervorragende technische Kompetenz gerne und geduldig an mich weiter. Von Andrea lernte ich u.a. alle Basics der Immunfluoreszenzfärbungen und dass die Durchflusszytometrie nicht so kompliziert ist, wie es anfangs scheint... Immer hatte sie auch ein Ohr für diverse Problemchen und sorgte mit Kaffee und Schokolade dafür, dass sich mancher Ärger in Wohlgefallen auflöste... Karin weihte mich u.a. in die Geheimnisse immunologischer Zellkulturen ein und sorgte dafür, dass ich akzeptieren lernte, dass es für das Misslingen eines Experimentes nicht immer eine logische Erklärung gab...

Im Forschungslabor der Kinderklinik Ulm danke ich Simone Fulda, Claudia Friesen, Joachim Wahl und Gudrun Strauß für diverse Unterstützungen, sei's moralischer Art oder das Bereitstellen von Material und fachlichen Ratschlägen. Geo Lahr sei herzlich gedankt für ihre Hilfe beim FoxP3 Nachweis!

Markus Ege möchte ich danken für seinen unvergleichlichen Humor, mit dem die Arbeit einfach leichter fiel, dafür, dass er alles, was er in unzähligen Experimenten für die magnetische Separation bestens optimiert hatte, offen und selbstverständlich weitergab, dafür, dass Statistik und Excel für mich keine Mysterien blieben und für den intensiven Austausch betreffend auch seines Schwerpunktes Allodepletion.

Auch Hans Fuchs und Moni Sparber möchte ich danken, für die zwar kurze, aber intensive Zeit mit Euch im Labor. Es hat einfach Spaß gemacht, mit Euch zu arbeiten!

Meiner Mutter, Theolinde Jacobsen, kann ich gar nicht genug danken! Ohne sie und ihrem unermüdlichen Einsatz für meine Kinder wäre diese Arbeit nie zustande gekommen!!! Auch Irma und Edeltraud Großmann und meinen Schwestern Stella, Laura und Sylvia danke ich herzlich für ihre liebevolle Unterstützung bei der Kinderbetreuung!

Meinem Vater, Manfred Jacobsen, danke ich für sein stetes Interesse an meiner Arbeit, für seine Mühe beim Drucken der Dissertation und dafür, dass ich immer wusste, auf ihn zählen zu können!

Unendlichen Dank möchte ich meiner Familie aussprechen: Gereon, meinem Mann für seine Liebe, für seinen unerschütterlichen Eifer, mich zu ermutigen, dafür, dass er das von mir Jahr für Jahr hinausgeschobene Ziel „dieses Jahr mit der Arbeit fertigzuwerden“ mit Humor genommen hat und dafür, dass er, wann immer es ihm möglich war, für unsere Kinder da war und mir so die Weiterarbeit ermöglichte. Unseren wunderbaren Kindern Saviya, Matteo, Mareike danke ich dafür, dass der Protest, wenn ich noch mal „kurz“ ins Labor musste, meistens gering ausfiel und dass sie mir (z.B. nach misslungenen Experimenten) immer gezeigt haben, was im Leben wirklich wichtig ist!

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

### **Depletion und Suppression humaner HLA-alloreaktiver T-Zellen durch CD95L-exprimierende Zellen**

im Forschungslabor der Kinderklinik Ulm unter der Leitung von Prof. Dr. K.M. Debatin, Abteilung Transplantationsimmunologie (Leitung: Prof. Dr. W. Friedrich) in Zusammenarbeit mit dem Institut für Immunologie in Marburg (Leitung Prof. Dr. S. Bauer) mit Betreuung und Unterstützung durch Frau PD Dr. Susanna Müller ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

- Exp. Hematol. Jun 2002 30 (6), suppl. 1 (ISEH Meeting Abstract)
- Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2005; 106: 1258.
- Cell Death Differ. (2007) 14: 480-488.

Eva-Maria Jacobsen